

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
1 février 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/07632 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/63,  
15/82, 5/10, A01H 5/00, 5/10

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02130

(22) Date de dépôt international: 25 juillet 2000 (25.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/09990 28 juillet 1999 (28.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): **RHO-  
BIO** [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte postale 9163,  
F-69263 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **PEREZ,  
Pascual** [FR/FR]; 17, chemin de la Pradelle, Varennes,  
F-63450 Chanonat (FR). **GARCIA, Denise** [FR/FR]; 48,  
route de la Roche Blanche, F-63450 Le Crest (FR).

(74) Mandataires: **TETAZ, Franck** etc.; Aventis CropScience  
S.A., Dépt. Propriété Industrielle, 14-20, rue Pierre Baizet,  
Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée:**

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING ISOGENIC TRANSGENIC LINES

(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE LIGNEES ISOTRANSGENIQUES

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining isogenic transgenic lines, characterised in that it comprises a step for targeting the genome receiving a T-DNA after transformation of a hybrid. The invention also concerns commercial hybrids produced by cross-breeding of the resulting isogenic transgenic lines with other lines of interest.

(57) Abrégé: Cette invention concerne un procédé d'obtention de lignées isotransgéniques caractérisé en ce qu'il comprend une étape permettant de cibler le génome receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride. Rentrent également dans le cadre de l'invention les hybrides commerciaux produits par croisement des lignées isotransgéniques ainsi obtenues avec d'autres lignées d'intérêt.

WO 01/07632 A1

## Procédé d'obtention de lignées isogéniques

5 L'invention concerne un procédé d'obtention de lignées isogéniques caractérisé en ce qu'il comprend une étape permettant de cibler le génome receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride, ainsi que les hybrides commerciaux produits à partir de ces lignées isogéniques.

10 Par l'expression 'lignées isogéniques', on entend des lignées isogéniques, l'isogénie étant définie par l'état d'un génotype ne différant d'un autre que par un très petit nombre de gènes (1 ou 2), souvent obtenu par rétrocroisement. Les lignées isogéniques selon l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont fixées en génotype pur 'lignée d'intérêt' sur l'ensemble du génome et ont intégré de façon stable l'ADN-T contenant le transgène. Elles ont la particularité d'être exemptes de tout fragment  
15 provenant de la lignée de transformation et pouvant constituer un fardeau génétique pour les étapes ultérieures de sélection.

Par 'ADN-T' ou ADN de transfert, on entend le fragment d'ADN contenant le gène d'intérêt et les séquences permettant son expression, qui est transféré et intégré dans le génome de l'hôte au cours de la transformation.

20 On distinguera dans le cadre de l'invention deux types de lignées : les lignées de transformation ou aptes à la transformation, de type A188 par exemple ; et les lignées non aptes à la transformation, nommées ci-après lignées d'intérêt ou lignées agronomiques. Par 'lignées élités', on désignera des lignées agronomiques présentant un potentiel commercial important à une période donnée. Les lignées élités présentent des propriétés agronomiques  
25 liées à l'expression de traits de caractère phénotypique relatifs notamment à leur croissance végétative et au rendement, ces propriétés agronomiques étant des caractéristiques techniques marquant leur potentiel commercial, c'est à dire leur aptitude à être employées dans des programmes de sélection variétale pour la mise sur le marché de lignées commerciales.

30 Le développement d'hybrides commerciaux implique généralement plusieurs étapes : (1) développement de lignées pures homozygotes parentales, à partir de matériel génétique sélectionné sur ses potentialités ; (2) croisement de ces lignées pour l'obtention

d'hybrides et (3) évaluation du potentiel commercial de ces hybrides, en fonction des traits de caractères phénotypiques acquis et de leur vigueur hybride ou hétérosis (croissance végétative et rendement). Ce potentiel commercial est d'autant plus grand que les lignées parentales appartiennent à des groupes hétérotiques variés et possèdent des caractéristiques intéressantes. D'où l'importance accordée à la Recherche et au Développement de lignées parentales améliorées, notamment par transgénèse.

Cependant, les techniques de transformation de plantes développées jusqu'ici, ne permettent pas aujourd'hui de transformer directement et efficacement la grande majorité des lignées agronomiques, dont les lignées élites, qui sont récalcitrantes ou non aptes à la transformation (efficacité nulle ou de l'ordre de 1/10 à 1/100), notamment chez le maïs.

De nombreux travaux ont donc porté d'une part, sur l'amélioration des conditions de culture *in vitro* pour les étapes de transformation et régénération et d'autre part, sur la recherche d'un matériel végétal de départ présentant une bonne efficacité de transformation.

Une meilleure connaissance des facteurs environnementaux a ainsi permis d'optimiser les conditions de culture *in vitro* (transformation et régénération) pour une adaptation à un plus grand nombre de génotypes ; mais ces améliorations ne suffisent pas à surmonter la récalcitrance de certains génotypes, notamment ceux d'intérêt agronomique (Armstrong et al., 1992).

Le choix d'un autre matériel végétal que les lignées pures, souvent récalcitrantes à la transformation, a donc été proposé pour la mise au point de procédés, notamment chez le maïs :

1) transformation d'une lignée donneuse apte à la transformation de type A188 (Armstrong et al., 1985) suivie de rétrocroisements successifs avec des lignées pures receveuses non aptes à la transformation, pour obtenir une lignée 'isotransgénique' (au moins 5 à 6 rétrocroisements nécessaires, si l'on veut atteindre l'isogénie parfaite). Dans la pratique, les lignées résultantes de ces rétrocroisements sont au mieux 'pseudo-isogéniques', car un fragment du génome de la lignée donneuse est irrémédiablement lié au transgène. Selon sa taille et sa nature, fonction des processus de recombinaison et/ou de la disponibilité limitée de marqueur moléculaire pour faire le tri, ledit fragment peut constituer un fardeau génétique gênant pour les étapes de sélection ultérieures ; de plus, les phénomènes de recombinaison qui permettraient de réduire ce fardeau sont des événements

rare, la recombinaison entre séquences homéologues étant moins efficace qu'entre séquences homologues, rendant obsolètes les gros efforts de rétrocroisements. Il y a donc un risque important de générer des effets génétiques négatifs dans le produit hybride final, via l'utilisation de matériel de départ de type A188 apte à la transformation.

5           2) transformation directe d'un hybride 'lignée de transformation x lignée d'intérêt agronomique' (Ishida et al., 1996). Celui-ci, associant les aptitudes à la transformation / régénération et les caractéristiques agronomiques de chacune des lignées parentales, peut apparaître comme un matériel végétal de départ plus favorable à la production d'hybrides commerciaux *in fine*. Mais les résultats obtenus par Ishida et al. (1996) montrent que  
10 l'efficacité de transformation de l'hybride est bien plus faible que celle obtenue pour la lignée de génotype A188. Par ailleurs, les risques de fardeau génétique dans le produit final ne sont pas évités, puisque le transgène peut s'intégrer sur l'un ou l'autre des chromosomes de l'hybride (c'est-à-dire sur le chromosome lignée donneuse de type A188 dans 50% des cas).

15           La demande internationale WO 98/32326 (Pioneer) propose de jouer sur les deux paramètres- conditions de culture in vitro et matériel végétal- pour améliorer l'efficacité de transformation d'une part, et rendre d'autre part le procédé de base décrit par Ishida et al. (1996) applicable à d'autres lignées que A188. Cette équipe mentionne une efficacité de transformation meilleure que celle obtenue avec le protocole de base, mais cette efficacité  
20 reste encore faible dans le cas des lignées non aptes à la transformation.

On ne disposait donc pas à ce jour de procédé global ni de matériel végétal pour l'obtention de lignées 'isotransgéniques' vraies, intégrant à la fois les besoins en haute fréquence de transformation (excluant l'utilisation de lignées pures non aptes à la transformation) et la nécessité d'avoir une isogénie vraie pour les lignées transgéniques  
25 produites (indiquant au contraire l'utilisation de ces lignées pures, pour éviter tout fardeau génétique provenant de la lignée de transformation).

La présente invention permet d'apporter une solution originale à ce problème en mettant au point un nouveau procédé d'obtention de lignées isotransgéniques intégrant une étape qui permet de cibler le génome receveur de l'ADN-T. Ce procédé, basé sur la  
30 transformation d'hybride, est en fait caractérisé par une étape de sélection des transformants primaires qui ont intégré uniquement l'ADN-T dans le génome de type non apte à la transformation (*a priori* 50% des transformants). Ces transformants sélectionnés



conduiront à la création de lignées isotransgéniques après rétrocroisements desdits transformants avec la lignée d'intérêt agronomique parentale.

Cette étape de sélection des transformants ayant intégré le transgène dans le génome de type non apte à la transformation n'avait jamais été suggérée ni décrite dans l'art antérieur. Elle est avantageuse en ce qu'elle permet d'obtenir *in fine* une lignée isotransgénique 'vraie', c'est-à-dire exempte de tout fragment provenant de la lignée apte à la transformation, tout en gardant un niveau d'efficacité de transformation acceptable. De plus, elle permet d'améliorer la rapidité du transfert du gène d'intérêt dans un génome pur, en diminuant le nombre de rétrocroisements nécessaires.

Le procédé selon l'invention, intégrant cette étape de sélection des transformants primaires, permet de mieux répondre aux exigences industrielles, en matière de rapidité et efficacité, que ne le faisaient les procédés décrits jusqu'à lors.

De plus, ce procédé présente un grand intérêt, notamment lorsque la lignée d'intérêt entre dans de nombreuses formules hybrides ou lorsqu'il s'agit de lignées dominant un marché important. Il permet la production de plantes transgéniques pouvant exprimer, à titre d'exemples, un ARN antisens, un ribozyme ou une protéine d'intérêt lui conférant une résistance aux maladies/pathogènes et/ou une qualité agronomique ou nutritionnelle améliorée (acides aminés, huile, amidon...).

L'utilisation de ce procédé permet également de varier les sources génétiques des lignées de grands groupes hétérotiques, utilisées comme lignées parentales pour la production d'hybrides commerciaux. Elle rend également possible l'empilement de plusieurs caractères transgéniques dans les lignées agronomiques sans addition de fragments provenant de la lignée de transformation, et pouvant faire l'objet d'un fardeau génétique. Cette perspective intéresse notamment la diversification des sources génétiques pour la production d'hybrides commerciaux ayant conservé une bonne vigueur hybride, voire même améliorée.

Selon un premier mode de réalisation, le procédé d'obtention de lignées isotransgéniques de plantes selon l'invention comprend les étapes suivantes de :

- a) transformation des cellules végétales d'un hybride de plante constitué par le croisement de deux lignées parentales, une lignée d'intérêt et une lignée apte à la transformation, avec un vecteur porteur d'un ADN-T contenant un transgène;

b) sélection des transformants primaires hybrides ayant intégré ledit ADN-T uniquement, dans le génome de la lignée d'intérêt ;

c) rétrocroisements avec la lignée parentale d'intérêt desdits transformants primaires sélectionnés en b), et sélection des individus issus de ces rétrocroisements jusqu'à l'obtention de lignées isotransgéniques.

De préférence, parmi les transformants primaires hybrides, sont préalablement choisis ceux qui présentent une insertion monolocus ou monocopie de l'ADN-T, c'est-à-dire ayant intégré de préférence une copie du transgène (monocopie) ou éventuellement plusieurs copies en tandem, au même locus chromosomique. Les individus monocopies sont notamment préférés en ce qu'ils ne sont pas affectés par le phénomène d'extinction de gènes, connu pour les insertions multicopies et qu'ils permettent un suivi simplifié du transgène. Par l'expression 'insertion sans séquence extrabordure', on entend des transformants qui ont intégré uniquement l'ADN-T contenant le transgène, sans le transfert de séquences plasmidiques extérieures à l'ADN-T, nommées extrabordures.

La sélection des transformants monolocus, monocopie de préférence, et dépourvus de séquence extrabordure, peut notamment être réalisée par la technique Southern avec plusieurs enzymes de restriction et plusieurs sondes (Southern, 1975), permettant d'identifier et caractériser l'insertion dans le génome de la plante, et de différencier ainsi les événements de transformation.

Le procédé est caractérisé en ce que l'étape de sélection des transformants primaires hybrides consiste à identifier les séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré pour déterminer le génome parent receveur dudit ADN-T.

Pour chaque transformant primaire qui s'est révélé conforme au phénotype attendu et qui a été sélectionné suivant les critères- monolocus ou monocopie et absence d'extrabordures- les séquences génomiques de l'hôte adjacentes à l'ADN-T peuvent être isolées et identifiées, par exemple via une méthodologie basée sur la PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki Rk. et al., 1988), de préférence IPCR (Inverse PCR, Does Mp. Et al., 1991). Le but étant d'identifier l'origine parentale du génome accepteur du transgène (lignée d'intérêt agronomique ou lignée de transformation).

Enfin l'identification, pour chaque transformant, du génome de la lignée parentale ayant intégré l'ADN-T, peut notamment être basée sur la mise en évidence d'un polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP, Restriction Fragment

Length Polymorphism, Burr B. et al., 1983) entre les lignées parentales et le transformant, en utilisant comme sondes, le ou les fragments génomiques adjacents, précédemment identifiés.

De façon alternative, le séquençage des bordures génomiques de l'ADN-T et la mise en évidence de SNP (Single Nucleotid Polymorphism) par comparaison avec les séquences des lignées parentales, peuvent également permettre l'identification du génome parent receveur.

De plus, lesdites séquences génomiques adjacentes identifiées peuvent encore être utilisées comme sondes sur une population de cartographie connue de l'homme de l'art, pour identifier le chromosome porteur de l'insertion et la position de celle-ci, selon les techniques de cartographie (par exemple Murigneux et al., 1993). Ceci permet de choisir quelques marqueurs autour de cette position, à utiliser avantageusement dans les étapes ultérieures de sélection des individus backcrossés.

La construction de vecteurs d'expression pour la transformation (étape a) est à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standards, comme décrit par exemple dans Sambrook et al. (1989). Lesdits vecteurs d'expression peuvent contenir une séquence nucléotidique en sens ou en antisens codant par exemple pour une protéine d'intérêt (qualité agronomique, nutritionnelle ou thérapeutique), ou protéine de résistance à des maladies et/ou pathogènes (herbicide, insecticide), ou un marqueur de sélection, ou un ARN antisens ou un ribozyme..., ainsi que des séquences régulatrices permettant son expression chez la plante (promoteur- constitutif ou inductible ou spécifique/ peptide adressage/ terminateur). Weising et al. (1988) décrit notamment des promoteurs, séquences de polyadénylation, gènes marqueurs de sélection, gènes reporteurs, enhancers, introns utilisables dans le cadre de l'invention. Parmi les séquences nucléotidiques d'intérêt, on peut citer tous les acides nucléiques permettant de donner ou améliorer un trait de caractère bénéfique chez la plante transgénique résultante. Par exemple, l'acide nucléique peut coder pour des protéines ou des transcrits ARN antisens pour favoriser une augmentation des valeurs nutritionnelles, du rendement, de la résistance aux pathogènes, aux maladies.... De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128.

A titre d'exemple, on peut citer :

- le gène bactérien dapA pour augmenter le taux de lysine ;

- le gène de l'endotoxine Bt ou d'un inhibiteur de protéase ou de protéines extraites de bactéries comme *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932) pour la résistance aux insectes ;
- parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases (WO92/01792), les glucanases (WO 93/02197), l'oxalate oxydase (WO 94/13790), ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et WO 99/09189), la drosomicine (WO 99/02717), la thanatine (WO 99/24594) ou l'héliomicine (WO 99/53053). Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun et al., 1993 ; Panabières et al., 1995).
- le gène *bar* ou *pat* conférant une tolérance au bialaphos, un gène bactérien ou végétal codant pour une EPSPS pour la résistance à l'herbicide glyphosate (US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,312,910, US5,633,435, US5,627,061, US 5,310,667, WO 97/04103) ; le gène codant pour la glyphosate oxydioréductase (US 5,463,175), un gène bactérien ou végétal codant pour une HPPD native, mutée ou chimère (WO 96/38567, WO 98/02562, WO 99/24585, WO 99/24586) conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD (i.e diketones, isoxazoles, mésotrione, etc) ;
- des gènes impliqués dans les procédés de biosynthèse conduisant à un changement de la qualité des produits de la plante transgénique, tels que les gènes codant pour des enzymes de la biosynthèse ou la dégradation de l'amidon (i.e synthases, enzymes de branchement de l'amidon...) ; gènes codant pour des protéines de stockage du grain (i.e sous-unités de gluténines, gliadines, hordéines) ; gènes liés à la force du grain dans le blé (i.e puroindolines).
- les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On

citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés (Korit, A.A. et al. ; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et WO 99/09189), la drosomicine (WO 99/02717), la thanatine (WO 99/24594) ou l'héliomicine (WO 99/53053).

- des gènes de la stérilité mâle artificielle (i.e barnase, and PR-glucanase sous contrôle d'un promoteur approprié) peuvent également être utilisées pour la production de semences hybrides.

Les séquences nucléiques d'intérêt peuvent également être introduites en tant qu'outil génétique pour générer des mutants et/ou assister l'identification, le marquage moléculaire ou l'isolation de segments de gènes de plantes. D'autres exemples sont décrits dans Weising et al.

Le vecteur d'expression comprenant la séquence nucléique d'intérêt à introduire dans la plante contiendra généralement un marqueur de sélection ou un gène rapporteur ou les deux, pour faciliter l'identification ou la sélection des cellules transformées. De façon alternative, le marqueur de sélection peut être porté par un second vecteur et utilisé en cotransformation. Ces séquences doivent être flanquées de séquences régulatrices appropriées pour permettre leur expression dans les plantes. Les marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme de métier et incluent, par exemple, des gènes de résistance aux antibiotiques et aux herbicides. Des exemples particuliers sont décrits dans Weising et al ou les demandes de brevets EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103. Un marqueur de sélection préféré est l'hygromycine B phosphotransferase (hpt), qui peut être dérivée de E. Coli. On peut également citer le gène de l'aminoglycoside phosphotransférase du transposon n5 (AphII) qui code pour la résistance aux antibiotiques kanamycine, neomycine, et G418, ainsi que

les gènes qui codent pour la résistance ou la tolérance au glyphosate, bialaphos, methotrexate, imidazolinones, sulfonylurées, bromoxynil, dalapon et dérivés. Les gènes marqueurs de sélection conférant une tolérance aux herbicides présentent également une utilité commerciale dans les plantes transformées résultantes. Le gène rapporteur est  
5 généralement un gène qui n'est pas présent ou exprimé dans l'organisme ou tissu receveur et qui code pour une protéine dont l'expression est mise en évidence par des propriétés détectables, comme un changement phénotypique ou une activité enzymatique. Des exemples sont donnés dans Weising et al. Parmi les gènes préférés, on peut citer le gène de la Chloramphenicol Acetyl Transferase (cat) de tn9 de *E. Coli*, le gène de la beta-glucuronidase (gus) au locus uidA de *E. Coli*, le gène de la Green Fluorescent Protein  
10 (GFP) de *Aequoria victoria*, et le gène de la luciférase de *Photinus pyralis*.

Les séquences régulatrices incluent également des promoteurs constitutif, inductible, spécifique d'un tissu ou d'un organe, ou spécifique du stade développement et qui peuvent être exprimés dans la cellule végétale. De tels promoteurs sont décrits dans  
15 Weising et al.

On peut également citer :

- les séquences régulatrices de l'ADN-T de *A. tumefaciens*, incluant la mannopine synthase, la nopaline synthase, l'octopine synthase
- le promoteur de l'alcool déshydrogénase de maïs ;
- 20 - les promoteurs induits par la lumière tels que le gène de la petite sous-unité de la ribulose-biphosphate-carboxylase d'une variété d'espèces et le promoteur du gène de la protéine de liaison chlorophylle a/b ;
- les promoteurs d'histone (EP 507 698), éventuellement combinés avec le premier intron de l'actine de riz (WO 99/34005) ;
- 25 - le promoteur de l'ubiquitine 1 de maïs (Christensen et al., 1996)
- le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou le promoteur 19S ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S), décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;
- le promoteur pCRU du gène de la cruciférine de radis permettant  
30 l'expression des séquences associées uniquement dans les semences (ou graines) de la plante transgénique obtenue (Depigny-This et al., 1992) ;

- les promoteurs pGEA1 et pGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993) et permettant une expression spécifique dans les graines ;
- 5 - le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (pAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1990 ;
- le promoteur HMWG (High Molecular Weight Glutenin) de blé par Robert et al., 1989 ;
- les promoteurs régulés au cours du développement tels que les promoteurs waxy, zéine ou bronze du maïs ;
- 10 - les promoteurs spécifiques d'un organe ou d'un stade de développement, tels que le promoteur de l'alpha-tubuline décrit dans US 5,635,618.
- le promoteur du gène de zéine de maïs (Pzéine) permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs (Reina et al., 1990) ;
- 15 - le promoteur N d'un clone génomique de maïs, dont le cDNA est référencé dans la publication de Shen et al. (1994).

On peut encore utiliser une séquence de régulation promotrice spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines (Datla, R. et al., 1997), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 20 98/45460), de l'oélosine (WO 98/45461), de l'ATS1 ou de l'ATS3 (WO 99/20775).

On peut également employer un promoteur inducible avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349), le promoteur HMG2 (US 5 25 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'acétyl-coA carboxylase synthase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

D'autres éléments tels que les introns, enhancers, séquences de polyadénylation et dérivées, peuvent également être présentes dans la séquence nucléique d'intérêt, pour 30 obtenir améliorer l'expression ou le fonctionnement du gène transformant. A titre d'exemple d'enhancer, l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus du tabac (VET) décrit par

Carrington & Freed (1990). Parmi les introns utilisables, le premier intron Adh1S de maïs peut être placé entre le promoteur et la séquence codante d'une séquence nucléique d'intérêt. Cet intron, inclus dans une construction génétique, est connu pour augmenter l'expression d'une protéine dans les cellules de maïs (Callis et al., 1987). On peut également utiliser le premier intron du gène *shrunk-1* de maïs (Maas et al., 1991), le premier intron du gène de la catalase du pois castor (*cat-1*) (Ohta et al., 1990) ; le second intron du gène *ST-LS1* de la catalase de pomme de terre (Vancanneyt et al., 1990) ; l'intron du virus DSV nain jaune du tabac (Morris et al. 1992) ; l'intron actine -1 (*act-1*) du riz (McElroy et al. 1990) et l'intron 1 de la triose phosphate isomérase (TPI) (Snowden et al., 1996). Cependant, une expression suffisante peut souvent être obtenue sans intron (Battraw et al., 1990).

Le vecteur d'expression peut aussi comprendre des séquences codant pour un peptide de transit, pour amener la protéine codée par le gène hétérologue dans les chloroplastes des cellules de plante. Ces peptides de transit bien connus de l'homme de métier peuvent inclure les peptides de transit simples ou multiples, obtenus par la combinaison de séquences codant pour au moins deux peptides de transit. Le peptide de transit peut être simple, comme un peptide de transit d'EPSPS (décrit dans le brevet US 5,188,642) ou un peptide de transit de celui de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (*ssu RuBisCO*) d'une plante, éventuellement comprenant quelques acides aminés de la partie N-terminale de la *ssu RuBisCO* mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la séquence N-terminale d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la *ssu RuBisCO* de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la *ssu RuBisCO* de maïs fusionnée au peptide de transit de la *ssu RuBisCO* de maïs tel que décrit avec sa séquence codante dans le brevet EP 508 909. Un peptide transit préféré est Peptide de Transit Optimisé (OTP) décrit dans le brevet US 5,635,618.

La transformation de cellules végétales de l'hybride peut être réalisée par les techniques connues de l'homme de métier.



On peut citer notamment les méthodes de transfert direct de gènes telles que la microinjection directe dans des embryoides de plante (Neuhaus et Coll., 1987), l'infiltration sous vide (Bechtold et al., 1993) ou l'électroporation (Chupeau et Coll., 1989) ou encore la précipitation directe au moyen de PEG (Schocher et Coll., 1986) ou le bombardement par canon de particules (Fromm M. et al., 1990).

On peut également infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'*Agrobacterium*. Selon un mode de réalisation du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné. Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article d'An et al. (1986), ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin et al., 1987.

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al). Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces deux vecteurs, la région de l'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droits et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence vir, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

De manière préférentielle, la transformation de cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole décrit par Ishida et al (1996), notamment à partir d'embryons immatures de 10 jours après la fécondation.

De façon alternative, on peut utiliser la méthode de transformation d'embryons immatures décrite dans la demande internationale WO 98/32326, ou la méthode de transformation des inflorescences de plantes monocotylédones décrite dans la demande de brevet WO 99/67357.

Les deux lignées parentales de l'hybride sont ainsi choisies : pour l'une, sur son aptitude à la transformation (lignée parentale de transformation) et pour l'autre, sur sa polyvalence ou son importance commerciale sur le marché (lignée parentale d'intérêt).

Actuellement, la lignée présentant la meilleure aptitude à la transformation par *Agrobacterium* est la lignée A188 ; c'est celle qui est généralement utilisée pour la production de transformant. Parmi les lignées de transformation et les lignées élites commerciales connues, on peut citer notamment celles décrites par Ishida et al (1996) et Pioneer (WO 98/32326).

Parmi les cellules susceptibles d'être transformées selon le procédé de l'invention, on peut citer à titre d'exemples des cellules de plantes de grandes cultures (maïs, blé, colza, tournesol, pois, soja, orge...) ou des plantes potagères et fleurs.

Les étapes de transformation (a) et sélection (étape b- procédé selon l'invention) décrites précédemment ont permis de sélectionner des transformants qui ont intégré le transgène dans le génome de type non apte à la transformation . Lesdits transformants sélectionnés contiennent 50% du génome de la lignée parentale de transformation et 50% du génome de la lignée parentale agronomique.

La reconversion vers une lignée fixée en génome d'intérêt pur (étape c), passe par des rétrocroisements (backcross) successifs avec la lignée parentale d'intérêt et une sélection des individus obtenus selon la méthode classique d'analyse phénotypique ou préférentiellement la sélection assistée par marqueurs (Hospital et al., 1992).

Cette sélection est basée notamment sur les critères suivants :

(i) variabilité autour du site d'intégration du transgène, avec élimination de tout fragment lié provenant de la lignée donneuse de transformation (sélection d'événements de recombinaison). La recombinaison génétique souhaitée est sélectionnée d'un côté du gène à une génération de rétrocroisement et de l'autre côté à la génération suivante.

(ii) recherche du meilleur ratio génome d'intérêt (rapport du % génome d'intérêt agronomique sur le % du génome global) pour l'ensemble du génome.

L'étape (i) s'avère limitante dans le cas où le transgène est inséré dans un génome de type A188 par exemple, car il est nécessaire d'éliminer tout fragment provenant de cette lignée de transformation en sélectionnant les événements de recombinaison les plus proches du transgène (événements rares). Cela requiert : d'effectuer les étapes de rétrocroisements sur un grand nombre de plantes pour sélectionner au moins une plante

recombinée correctement des deux côtés de l'insertion (2<sup>e</sup> rétrocroisement ou backcross) ; d'attendre un backcross supplémentaire pour appliquer, sur un nombre suffisant de plantes, une pression de sélection sur l'ensemble du génome. S'il est possible d'obtenir *in fine* des plantes fixées en génome d'intérêt à plus de 99% dès le 4<sup>e</sup> backcross, ces plantes resteront  
5 au mieux pseudoisogéniques au site d'insertion du transgène.

Dans le cas où le transgène est inséré dans un génome de type agronomique (lignée parentale d'intérêt), et que les transformants primaires sont sélectionnés pour cette caractéristique selon l'invention, cette étape (i) de sélection d'événements rares de recombinaison n'est plus nécessaire. En conséquence, on obtient une réduction potentielle  
10 du nombre de rétrocroisements nécessaires et/ou du nombre d'individus à tester et/ou du nombre de marqueurs pour la sélection, ainsi qu'il sera décrit à l'exemple 4. L'allègement du procédé global de reconversion vers le génome d'intérêt pur s'ajoute au bénéfice majeur de l'invention, qui est l'obtention d'une isogénie vraie pour les lignées transgéniques produites.

L'invention a également pour objet un procédé dans lequel sont sélectionnés dès le  
15 premier rétrocroisement en c) les individus dont le chromosome receveur de l'ADN-T a conservé un génotype entièrement de type lignée d'intérêt et qui ont un ratio génome d'intérêt sur l'ensemble du génome d'au moins 75%.

Rentre également dans le cadre de l'invention l'utilisation du procédé pour  
20 introgresser plusieurs caractères transgéniques dans une plante sans addition de fragments liés au transgène pouvant faire l'objet d'un fardeau génétique.

L'invention concerne également un procédé permettant de cibler le génome parent receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride, comprenant l'identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré.

Elle a également pour objet toute plante ou partie de plante, notamment semence transgénique obtenues selon l'invention, à l'une ou l'autre des étapes décrites  
25 précédemment.

Font également partie de l'invention les lignées isotransgéniques vraies obtenues à partir de transformants hybrides caractérisées en ce qu'elles sont fixées en génotype 'lignée d'intérêt' pur sur l'ensemble du génome et ont intégré de façon stable l'ADN-T contenant  
30 le transgène. En particulier, les lignées isotransgéniques vraies obtenues selon l'invention sont des lignées élit.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une étape ultérieure de croisement entre la lignée isotransgénique selon l'invention et une autre lignée d'intérêt, notamment une autre lignée isotransgénique selon l'invention contenant un transgène différent, pour l'obtention d'hybrides commerciaux.

5 L'invention concerne également les hybrides commerciaux ainsi produits.

Les figures et exemples ci-après illustrent l'invention sans en limiter la portée.

#### LEGENDES DES FIGURES

**Figure 1** : carte plasmidique d'un construit dérivé de pBIOS273

**Figure 2** : Mise en évidence par analyse RFLP sur les transformants primaires, du génome parental receveur de l'ADN-T.

#### EXEMPLES

La transformation du maïs à titre d'exemple, peut notamment être réalisée selon le protocole de Ishida et al (1996) qui utilise les propriétés naturelles d'*Agrobacterium tumefaciens* et la stratégie du système binaire (Hiei et al., 1994).

#### Exemple 1 : Préparation des vecteurs

15 Le plasmide superbinaire est le résultat d'une recombinaison homologe entre un vecteur intermédiaire porteur de l'ADN-T contenant le gène d'intérêt et/ou le marqueur de sélection, et le vecteur pSB1 de Japan Tobacco (EP 672 752) qui contient : les gènes virB et virG du plasmide pTiBo542 présent dans la souche supervirulente A281  
20 d'*Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 37349) et une région homologue retrouvée dans le vecteur intermédiaire permettant cette recombinaison homologe.

Le vecteur intermédiaire pour l'introduction du gène d'intérêt est le vecteur pBIOS 273. Ce vecteur a été généré en 2 grandes étapes :

- clonage du fragment BspDI/XhoI (pAct-Bar-terNos) du vecteur pDM 302 (Cao et al.,  
25 1992) dans le vecteur pSB12 (Komari T. et al, 1996) digéré par SmaI / BspDI : le vecteur pDM302 est digéré avec l'enzyme XhoI (site unique sur le vecteur), générant ainsi des extrémités cohésives 5' sortantes. Ces extrémités sont rendues franches après traitement à la Klenow. Une seconde digestion est ensuite effectuée avec BspDI (extrémités cohésives). La jonction des sites XhoI 'franc' et SmaI permet de recréer le site de coupure XhoI (en  
30 position 2363). Ces différentes étapes permettent un clonage orienté dans pSB12 et le vecteur résultant est appelé pBIOS 272.

- délétion du site XhoI en position 3363 du vecteur pBIOS 272 par digestion partielle avec XhoI et action de la DNA Polymerase I large fragment. Le vecteur obtenu, possédant un site unique XhoI, est nommé pBIOS 273.

5 Selon les techniques de clonage bien connues de l'homme de métier, un grand nombre de séquences codant pour un gène d'intérêt peuvent être clonées dans ce vecteur pBIOS 273, aux fins de l'invention (Figure 1).

Le vecteur intermédiaire est introduit dans les cellules d'*A. tumefaciens* souche LBA 4404 (Hoekema et al, 1983) contenant le vecteur pSB1 par électroporation selon les méthodes bien connues. Les agrobactéries contenant les vecteurs superbinaires sont  
10 sélectionnées sur milieu YT CaCl<sub>2</sub> en présence d'antibiotiques (dont les gènes de résistance sont portés respectivement par les plasmides des différents types), par exemple tétracycline et spectinomycine à une concentration de 50mg/l. Seuls les plasmides superbinaires recombinants porteront la résistance à la spectinomycine (gène initialement sur les plasmides intermédiaires, ne possédant pas d'origine de réplication dans  
15 *Agrobacterium*, étant de ce fait incapables de se répliquer dans cette bactérie). Ces plasmides sont ensuite caractérisés par restriction enzymatique et analyse Southern.

#### Exemple 2 : Transformation d'hybride de maïs

##### a) Obtention de l'hybride

Les lignées choisies pour fabriquer l'hybride à transformer (lignée A188 et lignée  
20 d'intérêt) sont semées en serre puis cultivées au phytotron ou en serre après repotage. Les plantes sont cultivées dans de la tourbe et arrosées quotidiennement avec une solution nutritive SuperPlantora (taux de NPK : 14-10-14 + 3% de MgO). Elles sont soumises à une photopériode de 16 ::8 et à une intensité lumineuse de 3 à 4000 Lux. La température moyenne est de 25°C. Dès l'émergence de l'épi, celui ci est couvert d'un sac en papier  
25 pour éviter toute contamination avec du pollen étranger. Ce sac est maintenu jusqu'au moment de la récolte de l'épi.

L'embryon hybride est produit soit en fécondant la lignée A188 avec du pollen de la lignée élite, soit en fécondant la lignée élite avec du pollen de A188.

9 à 10 jours après la fécondation l'épi est observé pour déterminer la taille des  
30 embryons. Si celle ci est comprise entre 1 et 1.2 mm, l'épi est récolté et les embryons seront aussitôt prélevés pour être mis en transformation selon le protocole décrit par Ishida et al.(1996).

### b) Transformation et régénération

Le protocole de transformation décrit par Ishida et al. (1996) a été choisi dans le cadre de cet exemple ; tous les milieux utilisés sont référencés dans ce protocole. La transformation débute avec une phase de co-culture où les embryons immatures des plantes de maïs sont mis en contact pendant au moins 5 minutes avec *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 contenant les vecteurs superbinaires. Les embryons sont ensuite placés sur milieu LSAs pendant 3 jours à l'obscurité et à 25°C. Une première sélection est effectuée sur les cals transformés : les 'embryons-cals' sont transférés sur milieu LSD5 contenant de la phosphinotricine à 5 mg/l et de la céfotaxime à 250 mg/l (élimination ou limitation de la contamination par *Agrobacterium tumefaciens*). Cette étape est menée 2 semaines à l'obscurité et à 25°C. La deuxième étape de sélection est réalisée par transfert des embryons qui se sont développés sur milieu LSD5, sur milieu LSD10 (phosphinotricine à 10 mg/l) en présence de céfotaxime, pendant 3 semaines dans les mêmes conditions que précédemment. La troisième étape de sélection consiste à exciser les cals de type I (fragments de 1 à 2 mm) et à les transférer 3 semaines à l'obscurité et à 25°C sur milieu LSD 10 en présence de céfotaxime.

La régénération des plantules est effectuée en excisant les cals de type I qui ont proliféré et en les transférant sur milieu LSZ en présence de phosphinotricine à 5 mg/l et de céfotaxime pendant 2 semaines à 22°C et sous lumière continue.

Les plantules ayant régénéré sont transférées sur milieu RM + G2 contenant 100mg/l d'Augmentin pendant 2 semaines à 22°C et sous illumination continue pour l'étape de développement. Les plantes obtenues sont alors transférées au phytotron en vue de leur acclimatation.

De façon alternative on peut utiliser le protocole décrit dans la demande de brevet WO 98/32326 pour transformer des embryons immatures de maïs.

#### Exemple 3 : Sélection des transformants qui ont intégré le transgène sur le génome d'intérêt (génome parental non apte à la transformation)

a) sélection des transformants monocopie et dépourvus de séquence plasmidique indésirable

Parmi les transformants primaires, sont donc préférentiellement choisis ceux qui présentent une insertion monolocus ou monocopie sans séquence plasmidique indésirable. La technique Southern avec plusieurs enzymes de restriction et plusieurs sondes

appropriées (Southern, 1975) peut notamment être utilisée pour identifier et caractériser l'insertion dans le génome de la plante, permettant ainsi de différencier les événements de transformation. Cette méthodologie permet en effet de mettre en évidence des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction obtenus avec une enzyme donnée et une sonde donnée, correspondant à des emplacements définis sur le génome.

On peut utiliser, à titre d'exemple, le protocole décrit dans Sambrook et al. (1989). L'ADN génomique est extrait à partir de feuilles des transformants primaires suivant un protocole d'extraction au CTAB (Dean C. et al., 1992). Cet ADN est ensuite digéré selon les techniques de biologie moléculaire bien connues, par une enzyme de restriction coupant au moins une fois à l'intérieur de l'ADN-T. A l'aide de sondes appropriées qui s'hybrident de part et d'autre du site de coupure, on peut ainsi caractériser l'insertion des deux côtés internes -bordures droite et gauche – de l'ADN-T suivant la procédure adaptée. Pour une même sonde et pour plusieurs individus, des différences observées dans la taille des bandes reflètent des sites d'insertion différents. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés sur un gel d'agarose de 0.9 à 1% puis transférés sur une membrane Hybond N+ (Amersham). L'ADN du plasmide intermédiaire comprenant l'ADN-T porteur du gène d'intérêt et du marqueur de sélection, est inclus dans l'analyse comme témoin. La membrane est hybridée avec des sondes homologues aux séquences du transgène étudié :

- une sonde spécifique du gène marqueur sélectif, dénommée S1.
- une sonde spécifique du gène d'intérêt, dénommée S2.
- deux sondes dénommées ex RB et ex LB (pour extra Right Border et extra Left Border) qui sont utilisées conjointement pour l'hybridation. Cette hybridation nous permet d'éliminer les plantes contenant des séquences externes à l'ADN-T (extra-bordures). Une intégration correcte suppose que seul l'ADN-T est inséré dans le génome de l'hôte, sans séquence extrabordure. Les séquences des plasmides de base étant connues (pBIOS273 dérivé de pSB12), les sondes ex RB et ex LB sont obtenues par amplification avec des oligonucléotides spécifiques des régions plasmidiques extra-bordures du T-DNA, RB2 et 3 pour ex RB, LB2 et 3 pour ex LB.

SEQ ID N°1 Oligo RB2 : 5' ATCATCCTGTGACGGAACCTTG 3'

SEQ ID N°2 Oligo RB3 : 5' AAGGGCGTGAAAAGGTTTATCC 3'

SEQ ID N°3 Oligo LB2 : 5' GCTCGGCACAAAATCACCAC 3'

SEQ ID N°4 Oligo LB3 : 5' CATAGTTCTCAAGATCGACAGC 3'

Les plantes retenues à l'issue de cette analyse moléculaire ne présentent pas de signal d'hybridation avec les sondes ex RB et ex LB, et présentent si possible une seule bande avec chacune des sondes S1 et S2, traduisant une insertion simple monocopie (une copie du gène de sélection et une copie du gène d'intérêt). Suivant la procédure adoptée, des différences dans la taille des bandes entre plantes seront le reflet d'insertions différentes et correspondant à des événements de transformation différents.

b) identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré

Pour chaque transformant primaire qui s'est révélé conforme au phénotype attendu et qui a été sélectionné suivant les critères- monolocus ou monocopie et absence d'extrabordures- les séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T peuvent être isolées et identifiées par exemple via une méthodologie basée sur la PCR. Le but étant d'identifier l'origine parentale du génome receveur du transgène (lignée d'intérêt ou lignée de transformation). Plusieurs techniques basées sur la PCR peuvent être utilisées, par exemple le PCR walking (Devic et al., 1997); de préférence, le kit commercial Universal GenomeWalker de la société Clontech peut être utilisé dans le cadre de cette invention. On peut suivre le protocole suivant, basé sur la notice d'utilisation de ce kit : l'ADN des transformants primaires précédemment sélectionnés est digéré séparément par 5 enzymes de restriction (enzymes qui génèrent des fragments d'ADN présentant des extrémités franches) ; les enzymes utilisées peuvent être celles préconisées par le fournisseur à site de restriction 6 paires de bases pb- DraI, Eco RV, PvuII, ScaI et StuI ou d'autres enzymes spécifiques de sites de restriction à 4 ou 5pb. Pour chaque échantillon, les fragments générés sont ensuite liés aux deux extrémités à l'adaptateur GenomeWalker fourni avec le kit. Chaque échantillon est ensuite séparé en deux (ech1 et ech2) pour pouvoir déterminer les séquences génomiques contiguës aux deux bordures de l'ADN-T. La récupération des régions génomiques flanquant les deux bordures de l'ADN-T permet non seulement de confirmer le résultat de l'intégration mais également de faciliter l'identification du parent receveur et de permettre une vérification de la cartographie génétique si nécessaire.

Deux types d'oligonucléotides sont désignés pour la mise en œuvre des amplifications PCR successives : les oligos AP pour Adaptor Primer, fournis par le kit ; et les oligos GSP pour Gene-Specific Primer, dont le choix dépend de la séquence du vecteur dérivé de pSB12 et des paramètres définis dans la notice d'utilisation du kit. Parmi les oligonucléotides GSP pouvant être utilisés selon l'invention, on peut citer les



oligonucléotides identifiés par le logiciel MacVector (version 6) à partir des caractéristiques décrites dans le Tableau ci-dessous.

Nom	Séquence	Taille	Tm(°C)	position (pBIOS273)	% GC
GSPLB1	ID NO 5	29	71,3	3020	58,6
GSPLB2	ID NO 6	29	64,9	3081	41,4
GSPLB3	ID NO 7	28	70,1	3021	57,1
GSPLB4	ID NO 8	27	70,1	3018	59,3
GSPLB5	ID NO 9	27	70,1	3019	59,3
GSPLB6	ID NO 10	27	68,7	3022	55,6
GSPLB7	ID NO 11	27	63,3	3064	40,7
GSPLB8	ID NO 12	27	63,3	3077	40,7
GSPLB9	ID NO 13	26	68,7	3019	57,7
GSPLB11	ID NO 14	26	68,7	3023	57,7
GSPLB13	ID NO 15	26	63,0	3078	42,3
GSPRB1	ID NO 16	29	67,5	571	48,3
GSPRB2	ID NO 17	29	67,5	592	48,3
GSPRB3	ID NO 18	29	67,5	655	48,3
GSPRB4	ID NO 19	29	66,2	656	44,8
GSPRB5	ID NO 20	28	67,4	570	50
GSPRB6	ID NO 21	28	66,1	591	46,4
GSPRB7	ID NO 22	28	66,1	654	46,4
GSPRB8	ID NO 23	28	66,1	655	46,4
GSPRB9	ID NO 24	27	67,4	569	51,9
GSPRB10	ID NO 25	27	66,0	590	48,1
GSPRB11	ID NO 26	27	70,1	614	59,3
GSPRB12	ID NO 27	27	64,6	653	44,4
GSPRB13	ID NO 28	27	64,6	654	44,4
GSPRB14	ID NO 29	26	65,9	568	50
GSPRB15	ID NO 30	26	64,5	589	46,2

Une première amplification PCR, utilisant par exemple les oligos de type GSPLB ou GSPRB selon qu'ils soient spécifiques d'une séquence interne de l'ADN-T côté RB ou LB, est effectuée comme suit :

- avec l'oligo AP1 spécifique de l'adaptateur et l'oligo GSPRBx pour échantillon1,
- avec l'oligo AP1 et l'oligo GSPLBx pour échantillon2.

Les produits d'amplification sont dilués puis soumis à une deuxième amplification:

- avec l'oligo AP2 spécifique de l'adaptateur et l'oligo GSPRBy pour échantillon1,
- avec l'oligo AP2 et l'oligo GSPLBy pour échantillon2.

Ces oligonucléotides GSP sont utilisables notamment pour tous les vecteurs dérivés de pBIOS273, dans lesquels seule la séquence du gène d'intérêt serait remplacée.

- 5 Des séquences spécifiques des gènes insérés à l'intérieur de l'ADN-T peuvent être également utilisées.

Les produits d'amplification PCR obtenus sont analysés sur gel et l'on choisit préférentiellement ceux qui sont supérieurs à 200-300 pb. Ces produits d'amplification PCR - qui contiennent une partie de séquence connue (entre oligo GSP et bordure de l'ADN-T) et une partie de séquence génomique inconnue (entre oligo AP et bordure de l'ADN-T) sont ensuite clonés par exemple dans le vecteur plasmidique pGEM-T (Promega) selon les recommandations du fournisseur puis séquencés avec les oligonucléotides universels direct et reverse. Le cas échéant, des oligonucléotides internes pourront être utilisés pour compléter les données. Il est ainsi possible de générer des sondes  
15 'spécifiques' de la séquence génomique de l'hôte bordant l'ADN-T.

c) Identification du génome parent receveur.

Cette dernière étape conduisant à l'identification, pour chaque transformant, du génome de la lignée parentale ayant intégré l'ADN-T, peut notamment être réalisée selon le protocole suivant (Sambrook et al. 1989). Les bordures récupérées sont utilisées comme  
20 sondes et hybridées sur un transfert de gel d'électrophorèse contenant l'ADN digéré séparément par différentes enzymes de restriction des différents transformants et des deux lignées parentales. La mise en évidence d'un polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP) homologues à la sonde - et donc au locus d'insertion - entre les lignées parentales, nous permet de définir le parent receveur par comparaison avec le profil du  
25 transformant, hétérozygote pour l'insertion. Par l'expression 'hétérozygote (hémizygote) pour l'insertion', on entend que le transformant hybride porte l'ADN-T contenant le transgène sur un seul des deux chromosomes. Une intégration dans la lignée parentale d'intérêt se traduit donc par un RFLP par rapport à la lignée d'intérêt et non par rapport à l'autre parent. Dans le cas d'une insertion simple dans la lignée d'intérêt, le profil du  
30 transformant primaire se caractérise par deux bandes : une bande de taille identique à celle du parent de transformation et une bande de taille différente de celle du parent d'intérêt. A

titre d'exemple la Figure 2 présente les profils attendus pour les parents et le transformant, dans le cas d'une insertion dans le chromosome de l'un ou l'autre des parents (2 cas).

L'identification du parent receveur peut également être obtenue selon une autre alternative, qui consiste à utiliser les données de séquençage des bordures génomiques de l'ADN-T obtenues en b) pour mettre en évidence des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) entre les lignées parentales. Après clonage dans pGEM-T de la séquence adjacente génomique récupérée et détermination de la séquence complète, des oligonucléotides peuvent être désignés sur la séquence et utilisés pour de nouvelles amplifications PCR sur les lignées parentales et le transformant. S'il existe un polymorphisme nucléotidique entre les deux parents pour la portion génomique ayant servi à désigner les oligonucléotides, une insertion dans la lignée d'intérêt se traduira par une amplification pour la lignée d'intérêt et le transformant et pas d'amplification pour l'autre parent. Si par contre, aucun polymorphisme n'est détecté (amplification d'un même fragment chez les deux lignées parentales, dans le cas d'un fragment génomique conservé), le séquençage desdits fragments amplifiés chez les lignées parentales sera nécessaire. L'analyse comparative avec les séquences adjacentes génomiques du transformant, identifiées et séquencées en b), déterminera alors le parent receveur du transgène. Selon l'une ou l'autre méthode, il sera possible de différencier les lignées pseudo-isogéniques obtenues par les procédés décrits dans l'art antérieur des lignées isotransgéniques vraies obtenues selon l'invention.

Exemple 4 : Rétrocroisements avec le parent d'intérêt et sélection des individus jusqu'à l'obtention de lignées isotransgéniques.

Les étapes précédentes ont permis de sélectionner des transformants qui ont intégré le transgène dans le génome d'intérêt; par ailleurs lesdits transformants contiennent 50% en génome parent de transformation et 50% en génome d'intérêt.

Préférentiellement, la sélection des plantes issues des rétrocroisements avec la lignée parentale d'intérêt, est assistée par marqueurs selon les méthodes connues, notamment celle décrite par Ragot et al. (1995).

A titre comparatif et démonstratif des avantages de la sélection des transformants primaires selon l'invention, sera décrit en préambule le cas d'un processus de sélection après insertion du transgène dans le génome de type A188.

Cas d'une insertion sur un chromosome de type A188 (pas de sélection des transformants primaires)

Classiquement, la recombinaison génétique souhaitée est sélectionnée d'un côté du gène à une génération de rétrocroisement et de l'autre côté à la génération suivante. La taille du génome du maïs étant estimée à 2000 centimorgans (cM), les événements de recombinaisons à sélectionner lors des deux premiers rétrocroisements (BC1 et BC2), pour ne transférer que 1/1000<sup>ème</sup> du génome non-élite lié au transgène, devront se situer à 1cM de part et d'autre de l'insertion, respectivement.

La sélection des événements de recombinaison assistée par des marqueurs prédéfinis (proches du transgène) est effectuée en BC1 et BC2 sur un nombre de plantes calculé comme suit : le nombre N de plantes à tester pour obtenir 1 plante recombinée à 1cM avec une probabilité de 95%, est  $N = (\log 0,05) / (\log(1-0,01)) \sim 300$  plantes, selon la loi de probabilité bien connue. Sachant qu'une seule plante recombinée est obtenue à l'issue de ces 2 rétrocroisements, il paraît difficile d'appliquer de surcroît une sélection pour un ratio génome d'intérêt optimal. Les ratios génome d'intérêt attendus en BC1 et BC2 sont en moyenne de 75% et 87,5% respectivement. Une pression de sélection sur l'ensemble du génome ne pourra véritablement être appliquée qu'en BC3, avec une centaine de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome de maïs (banque de donnée de l'Université du Missouri).

La reconversion en génome d'intérêt, pour ce cas particulier, nécessite d'effectuer les étapes de rétrocroisements sur un grand nombre de plantes (sélection d'événements rares sur le chromosome porteur) et d'attendre au moins le 3<sup>e</sup> backcross pour exercer la seconde pression de sélection, sur l'ensemble du génome. Enfin, les plantes obtenues *in fine* restent au mieux pseudo-isogéniques (fardeau génétique potentiel).

Backcross	Sélection événement recombinaison au site d'insertion du transgène		Caractérisation de l'ensemble génome pour le génotype d'intérêt	
	Nb plantes testées	Plante avec bonne recombinaison	Nb marqueurs à tester sur génome hétérozygote résiduel	% génome d'intérêt
BC1	300	1	100	75
BC2	300	1	50	87,5
BC3	100		25	96,8
BC4	100		7	99,2

Nb total tests :  $(300 \times 1) + 100 + (300 \times 1) + 50 + (100 \times 25) + (100 \times 7) = 3950$  tests, pour sélectionner **1 plante** qui soit **pseudoisogénique** au site du transgène (porte 1/1000 du génome A188 lié au transgène soit en moyenne 50 à 80 gènes, le génome de maïs possédant en moyenne 50000 à 80000 gènes) et **fixée à plus de 99% en génome d'intérêt en BC4**.

5

Cas d'une insertion sur un chromosome de la lignée parentale d'intérêt (sélection selon l'invention du transformant primaire correspondant, avant rétrocroisements avec le parent d'intérêt).

Selon les orientations choisies en fonction des priorités accordées à la biotechnologie, et/ou la production/rendement et/ou la sélection, plusieurs schémas de sélection sont possibles, intégrant le cas échéant une présélection sur le chromosome receveur de l'insertion. Contrairement au cas d'une insertion dans un génome de type A188, on sélectionnera ici des événements de recombinaison situés loin du transgène ou aucune recombinaison sur le chromosome receveur du transgène.

A titre d'exemples, on peut citer les options suivantes.

**Option 1** : Pas de sélection au site d'intégration du transgène ; sélection ratio génome d'intérêt dès BC1.

Backcross	Sélection événement recombinaison au site d'insertion du transgène		Caractérisation de l'ensemble génome pour le génotype d'intérêt	
	Nb plantes testées	Plante avec bonne recombinaison	Nb marqueurs	% génome d'intérêt
BC1	100		100	87,5
BC2	100		25	≈ 100
BC3	100		7	≈ 100

Nb total tests :  $(100 \times 100) + (100 \times 25) + (100 \times 7) = 13200$  tests, pour sélectionner **1 plante isogénique vraie** au site du transgène et **fixée à ≈ 100% en génome d'intérêt en BC3** (gain de un rétrocroisement).

**Option 2** : Sélection en BC1 de l'individu ayant le chromosome porteur du transgène qui soit entièrement de type lignée d'intérêt ; sélection en BC3 pour le ratio génome d'intérêt.

Connaissant le chromosome sur lequel est inséré l'ADN-T (cartographie), il est possible de sélectionner en BC1, à l'aide de 10 marqueurs répartis sur ce chromosome, une plante pour laquelle l'intégrité du chromosome receveur d'intérêt est conservée (aucun événement de recombinaison). Sachant que les chromosomes font une longueur moyenne de 200cM, la probabilité d'avoir une plante sans événement de recombinaison est

$P=(0,99)^{200} \sim 0,14$ . Le nombre N de plantes à tester avec une probabilité de 95% de l'obtenir est  $N = (\log 0,05) / (\log(1-0,14)) \sim 20$ .

La plante ainsi sélectionnée sera backcrossée avec le parent d'intérêt jusqu'à la reconversion totale (100%) en génome d'intérêt sur l'ensemble du génome.

Backcross	Sélection de l'intégrité génome élite sur le chromosome porteur du transgène, (10 marqueurs)		Caractérisation de l'ensemble génome pour le génotype d'intérêt	
	Nb plantes testées	Plante avec chromosome élite	Nb marqueurs	% génome d'intérêt
BC1	20	1		75
BC2	100			87,5
BC3	100		25	$\approx 100$
BC4	100		7	$\approx 100$

5 Nb total tests :  $(20 \times 10) + (100 \times 25) + (100 \times 7) = 3400$  tests pour sélectionner 1 plante isogénique vraie au site du transgène et fixée à  $\approx 100\%$  en génome d'intérêt dès BC3.

Selon les schémas, on recherchera une réduction du nombre de backcross (rapidité de production) ou une réduction du nombre de plantes à utiliser pour les rétrocroisements, en plus de l'isogénie obtenue de fait selon le procédé de l'invention.

#### 10 Exemple 5 : Production d'hybrides commerciaux

Selon les techniques connues de l'homme de métier et ses connaissances en matière de floraison pour chaque lignée élite parentale (Gallais A. et al., 1983), il est possible de croiser lesdites lignées isotransgéniques obtenues à l'exemple 4, en vue d'obtenir des hybrides commerciaux.

#### 15 Exemple 6 : Détermination du génome d'insertion du transgène

13 événements ont été obtenus après transformation d'embryons hybrides selon le protocole décrit précédemment à l'exemple 2. Ces événements ont ensuite été analysés par Southern, pour déterminer le nombre de copies du transgène intégré, comme décrit précédemment à l'exemple 3 (a). 3 de ces événements se sont avérés être monocopie.

20 Le transformant 152-2E, choisi pour la récupération des bordures génomiques décrite ci-dessous, a été obtenu après transformation avec le plasmide superbinaire recombinant pRec 290 issu de pBIOS 290, dérivé de pBIOS 273 par l'intégration au site XhoI d'une cassette « Pro HMWG-PhyII-Nos 3' – Pro HMWG-PhyII-Nos 3' ». Ladite cassette est obtenue selon les techniques de clonage classiques, à partir de la séquence Pro  
25 HMWG de blé (Roberts et al The Plant Cell, 1 :569-578, 1989), des séquences

nucléotidiques PhytI (N° d'accès EMBL, GenBank : AJ223470) et PhytII (N° d'accès EMBL, GenBank : AJ223471), et de la séquence Nos3' (Depicker et al., Mol. Gen. Genet. 235 (2-3) : 389-396, 1992) et des enzymes de restriction appropriées.

La récupération des bordures génomiques a été réalisée du côté bordure droite (RB) par la technique de PCR ancrée en utilisant le kit Genome Walker (Clontech laboratories inc., Palo Alto, California). Comme décrit à l'exemple 3 (b), l'identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré comprend les étapes suivantes :

Le couple d'oligonucléotides GSPRB3/AP1 a permis de réaliser la première PCR sur de l'ADN du transformant 152-1E digéré à EcoRV. Le produit de cette amplification a ensuite été soumis à une deuxième PCR avec le couple d'oligonucléotides GSPRB9/AP2.

Les caractéristiques des oligonucléotides GSPRB3 et GSPRB9 sont décrites dans le tableau de l'exemple 3 et correspondent aux séquences ID N0 18 et ID N0 24 en annexe.

Les oligonucléotides AP1 et AP2 sont ceux fournis dans le kit Genome Walker et les conditions de PCR sont celles préconisées par le fabricant Clontech. Le fragment bordure de 380 pb obtenu à cette dernière étape a été cloné dans le vecteur pGEMT (Promega corporation, Madison, Wisconsin), pour être amplifié et utilisé comme sonde.

L'identification du génome receveur décrit à l'exemple 3 (c), à partir du fragment bordure récupéré, consiste à hybrider ce fragment sonde sur un transfert de gel d'électrophorèse contenant l'ADN du transformant 152-2E digéré avec EcoRV ainsi que l'ADN des 2 lignées parentales de l'hybride (A188 et L2) et celui de 6 autres transformants.

Le résultat de l'hybridation est représenté sur la figure 3 : sur cette autoradiographie, on visualise de l'ADN correspondant à 7 transformants différents, sachant qu'il y a de 1 à 3 plantes par transformant.

L'hybridation avec la sonde bordure met en évidence 1 bande spécifique au génotype A188 (1.7Kb) et 1 spécifique de la lignée élite L2 (2.5 Kb). On retrouve ces 2 bandes chez tous les transformants (prouvant bien qu'ils sont issus de l'hybride) sauf pour l'événement t152-1E, qui lui présente une bande plus basse à 0.8 Kb environ. On en déduit que le transgène s'est inséré dans le fragment attendu EcoRV de 1.7 Kb du génome de la lignée A188.

Cette expérience confirme donc la possibilité d'identifier, selon le protocole décrit, le génome d'insertion de l'ADN-T dans le cas de transformant produit par la technique de transformation d'hybride, génome A188 dans ce cas précis.



Selon le même protocole, il est également possible d'obtenir des transformants pour lesquels l'insertion de l'ADN-T s'effectue dans le génome élite, avec une probabilité de 1 transformant sur 2 en moyenne.

Dans le cas où le génome du parent élite est identifié comme le génome receveur de l'insertion de l'ADN-T, des rétrocroisements peuvent être réalisés avec le parent d'intérêt et testés en sélection jusqu'à l'obtention de lignées isogéniques, comme décrit précédemment à l'exemple 4.

### BIBLIOGRAPHIE

- 10 An et al, Plant Physiol., 81 : 86-91, 1986.  
Armstrong, C.L. et al., Maize Genet. Coop. News Letter 59:92-93, 1985.  
Armstrong C.L. et al., Theor Appl Genet 84 :755-762, 1992.  
Battraw et al., Plant Mol. Biol., 15 :527, 1990.  
Bechtold N. et al., Comptes rendus Académie des Sciences Paris Serie 3, 316 : 1194-1199,  
15 1993.  
Burr B. et al., Genetic Engineering : principles and methods. Setlow A, Hollaender (eds.)  
Plenum press NY 5 : 45-59, 1983.  
Cao et al., Plant Cell Reports : 11 : 586-591, 1992.  
Callis et al., Genes Dev., 1 :1183, 1987.  
20 Carrington J.C. et Freed D.D, Journal of Virology, 64(4) : 1590-1597, 1990.  
Chuveau et al., Biotechnology, 7(5) : 503-508, 1989.  
Christensen et al., Transgenic Res., 5 : 213, 1996.  
Datla R. et al., Biotechnology Ann. Rev., 3 :269-296, 1997.  
Dean C. et al., Plant Journal, 2, 69-81, 1992.  
25 Depigny-This et al., Plant. Mol. Biol 20 : 467-479, 1992.  
Devic et al., Plant Physiol and Biochem., 35(4) : 331-33, 1997.  
Does Mp et al., Plant. Mol. Biol., 17(1) : 151-3, 1991.  
Fromm M. et al., Biotechnology, 8 : 833-839, 1990.  
Gallais A. et al., Agromais, 20, 40, 1983.  
30 Gaubier et al., Mol. Gen. Genet., 238 :409-418, 1993.  
Hiei et al., The plant Journal 6 : 271-282, 1994.  
Hospital et al., Genetics, 132 : 1199-1210, 1992.

- Hoekema et al, Nature, 303, 179-180, 1983.
- Ishida et al., Nature Biotechnology, 14 :745-750, 1996.
- Jouanin et al., Plant. Sci., 53 : 53-63, 1987.
- Kamoun S. et al., Mol Plant Microbe Interact, 6(5) :573-81, Sept-Oct 1993.
- 5 Kay et al., Science 236 : 1299-1302. 1987.
- Komari T. et al., The Plant Journal. 10(1) : 165-174, 1996.
- Korit A.A et al., Eur. J. Biochem., 195, 329-334, 1991.
- Maas et al., Plant Mol. Biol., 16 :199, 1991.
- McElroy et al., Plant Cell, 2 : 163-171, 1990.
- 10 Morris et al., Virology, 187 :633, 1992.
- Murigneux et al., Theor. Appl. Genet. 87 : 278-287, 1993.
- Neuhaus G. et al., Theoretical and Applied Genetics, 75(1) : 30-36, 1987.
- Ohta et al., Plant Cell Physiol, 31 :805, 1990.
- Panabieres F. et al., Mol Plant Microbe Interact, 8(6) : 996-1003, Nov-Dec 1995.
- 15 Ragot et al., Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires, Les Colloques, n° 72,  
Ed Reina et al., N.A.R, 18 :6426, 1990
- Robert et al., Plant Cell, 1 : 569-578, 1989.
- Saiki Rk. et al., Science 29 : 487-491, 1988.
- Sambrook et al., Molecular Cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory  
20 Press, New York, 1989.
- Schocher et al., Biotechnology, 4 : 1093-1096, 1986
- Shen et al., Plant. Mol. Biol., 26 : 1085-1101, 1994.
- Snowden et al., Plant Mol. Biol., 31 :689, 1996.
- Southern, Journal of molecular Biology, 98 : 503-517. 1975.
- 25 Vancanneyt et al., Mol Gen. Genet, 220 :245, 1990.
- Watson et al., Adn recombinant, Ed. De Boeck université, 273-292.
- Weising et al., Annual Rev. Genet, 22 : 241, 1988.

## REVENDICATIONS

1- Procédé d'obtention de lignées isotransgéniques de plantes, comprenant les étapes suivantes de :

- 5 a) transformation des cellules végétales d'un hybride de plante constitué par le croisement de deux lignées parentales, une lignée d'intérêt et une lignée apte à la transformation, avec un vecteur porteur d'un ADN-T contenant un transgène;
- b) sélection des transformants primaires hybrides ayant intégré ledit ADN-T  
10 uniquement, dans le génome de la lignée d'intérêt ;
- c) rétrocroisements avec la lignée parentale d'intérêt desdits transformants primaires sélectionnés en b), et sélection des individus issus de ces rétrocroisements jusqu'à l'obtention de lignées isotransgéniques.

2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de sélection des  
15 transformants primaires hybrides consiste à identifier les séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré pour déterminer le génome parent receveur dudit ADN-T.

3- Procédé selon la revendication 2, dans lequel la détermination du génome parent receveur dudit ADN-T à partir desdites séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T se fait selon une technique de RFLP ou une méthode de séquençage.

20 4- Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel sont sélectionnés dès le premier rétrocroisement en c) les individus dont le chromosome receveur de l'ADN-T a conservé un génotype entièrement de type lignée d'intérêt et qui ont un ratio génome d'intérêt sur l'ensemble du génome d'au moins 75%.

25 5- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape ultérieure de croisement entre la lignée isotransgénique selon l'invention et une autre lignée d'intérêt, notamment une autre lignée isotransgénique contenant un autre transgène, pour l'obtention d'une lignée hybride.

30 6- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules végétales proviennent d'une espèce de grande culture choisie parmi le maïs, blé, colza, tournesol, pois, soja, orge ou d'une espèce potagère ou florale.

7- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ADN-T comprend notamment une séquence nucléotidique codant pour une protéine conférant des propriétés agronomiques et/ou de résistance aux maladies.

5 8- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les lignées isotransgéniques obtenues sont des lignées élitaires commerciales.

9- Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle permet l'introgession de plusieurs caractères transgéniques dans une plante sans addition de fragments liés au transgène pouvant faire l'objet d'un fardeau génétique.

10 10- Procédé permettant de cibler le génome parent receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride, comprenant l'identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré.

11- Plantes ou parties de plantes, notamment semences transgéniques obtenues selon l'invention, à l'une ou l'autre des étapes décrites dans les revendications 1 ou 5.

15 12- Lignées isotransgéniques vraies obtenues à partir de transformants hybrides selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles sont fixées en génotype lignée d'intérêt pur sur l'ensemble du génome et ont intégré de façon stable l'ADN-T contenant le transgène.

13- Hybrides commerciaux produits selon le procédé décrit à la revendication 5.

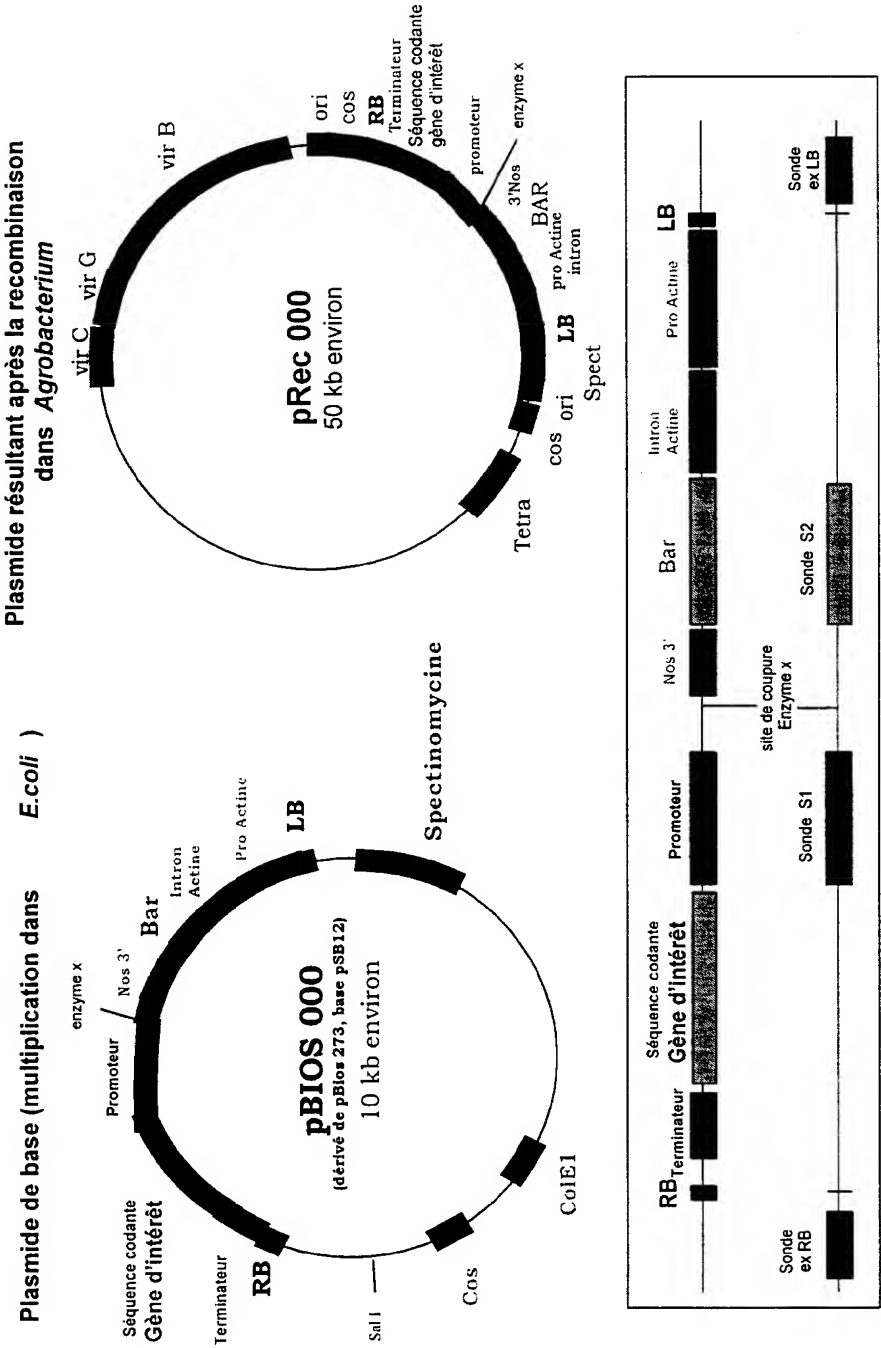
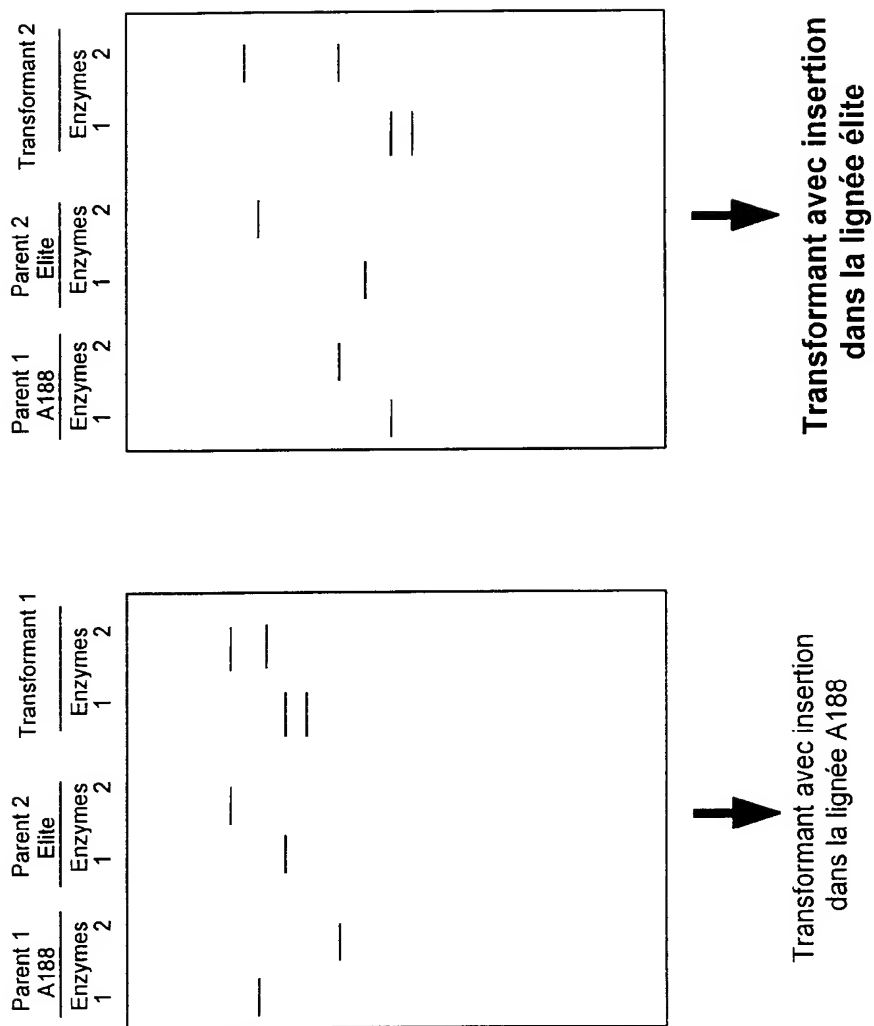


Figure 1



**Figure 2 : Hybridation des blots avec sondes spécifiques des bordures génomiques de chacun des transformants.**

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; RHOBIO

&lt;120&gt; Procédé d'obtention de lignées isotransgéniques

&lt;130&gt;

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 30

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; synthetic construct

&lt;400&gt; 1

atcatcctgt gacggaactt tg 22

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; synthetic construct

&lt;400&gt; 2

atcatcctgt gacggaactt tg 22

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; synthetic construct

&lt;400&gt; 3

gctcggcaca aaatcaccac 20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; synthetic construct

&lt;400&gt; 4

catagttctc aagatcgaca gc 22

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; synthetic construct

&lt;400&gt; 5

gcaggcatgc aagcttcagc tgctcgatc 29

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; synthetic construct

&lt;400&gt; 6

ccgcaatgtg ttattaagtt gtctaagc 28

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; ADN

<213> synthetic construct

<400> 7  
caggcatgca agcttcagct gctcgatc 28

<210> 8  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 8  
ctgcaggcat gcaagcttca gctgctc 27

<210> 9  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 9  
tgcaggcatg caagcttcag ctgctcg 27

<210> 10  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 10  
aggcatgcaa gcttcagctg ctcgatc 27

<210> 11  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 11  
cagtacatta aaaacgtccg caatgtg 27

<210> 12  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 12  
acgtccgcaa tgtgttatta agttgtc 27

<210> 13  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 13  
tgcaggcatg caagcttcag ctgctc 26

<210> 14  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 14  
ggcatgcaag cttcagctgc tcgatc 26

<210> 15  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> synthetic construct



<400> 15  
cgtccgcaat gtgttattaa gttgtc 26  
<210> 16  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 16  
atgatcagat tgtcgtttcc gccttcag 29  
<210> 17  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 17  
gactccctta attctccgct catgatcag 29  
<210> 18  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 18  
gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacg 29  
<210> 19  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 19  
tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaac 29  
<210> 20  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 20  
tgatcagatt gtcgtttccc gccttcag 28  
<210> 21  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 21  
actcccttaa ttctccgctc atgatcag 28  
<210> 22  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 22  
cgggttctgtc agttccaaac gtaaaacg 28  
<210> 23  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 23

gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaac 28  
<210> 24  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 24  
gatcagattg tcgtttcccg ccttcag 27  
<210> 25  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 25  
ctcccttaat tctccgctca tgatcag 27  
<210> 26  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 26  
tcatcggcgg gggtcataac gtgactc 27  
<210> 27  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 27  
ggttctgtca gttccaaacg taaaacg 27  
<210> 28  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 28  
cggttctgtc agttccaaac gtaaaac 27  
<210> 29  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 29  
atcagattgt cgtttcccg cttcag 26  
<210> 30  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> synthetic construct

<400> 30  
tcccttaatt ctccgctcat gatcag 26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. onal Application No  
PCT/FR 00/02130

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/63 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00 A01H5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 32326 A (PIONEER HI BRED INT) 30 July 1998 (1998-07-30) cited in the application abstract; examples 6,7 ---	1,6-8, 11-13
A	ISHIDA Y ET AL: "HIGH EFFICIENCY TRANSFORMATION OF MAIZE (ZEA MAYS L.) MEDIATED BY AGROBACTERIUM TUMEFACIENS" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 14, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 745-750, XP002046364 ISSN: 0733-222X cited in the application abstract page 749, right-hand column -page 750, left-hand column --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1,6,7, 11,12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center;">8 December 2000</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center;">15/12/2000</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center;">Ceder, O</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. onal Application No

PCT/FR 00/02130

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHYI ET AL.: "Locations and stability of Agrobacterium mediated Ti plasmid insertions in the lycopersicon genome"</p> <p>MOLECULAR &amp; GENERAL GENETICS, vol. 204, 1986, pages 64-69, XP000920599 abstract</p> <p>---</p>	<p>1,3,7, 11,12</p>
A	<p>UMBECK ET AL.: "Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants"</p> <p>CROP SCIENCE, vol. 29, 1989, pages 196-201, XP000920567 page 197, left-hand column</p> <p>-----</p>	<p>1,7,11, 12</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9832326 A	30-07-1998	US 5981840 A	09-11-1999
		AU 6036898 A	18-08-1998
		EP 0971578 A	19-01-2000
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. a Internationale No  
PCT/FR 00/02130

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/63 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00 A01H5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98 32326 A (PIONEER HI BRED INT) 30 juillet 1998 (1998-07-30) cité dans la demande abrégé; exemples 6,7 ---	1,6-8, 11-13
A	ISHIDA Y ET AL: "HIGH EFFICIENCY TRANSFORMATION OF MAIZE (ZEA MAYS L.) MEDIATED BY AGROBACTERIUM TUMEFACIENS" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 14, no. 6, 1 juin 1996 (1996-06-01), pages 745-750, XP002046364 ISSN: 0733-222X cité dans la demande abrégé page 749, colonne de droite -page 750, colonne de gauche --- -/--	1,6,7, 11,12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ceder, 0

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/02130

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHYI ET AL.: "Locations and stability of Agrobacterium mediated Ti plasmid insertions in the lycopersicon genome" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 204, 1986, pages 64-69, XP000920599 abrégé	1,3,7, 11,12
A	----- UMBECK ET AL.: "Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants" CROP SCIENCE, vol. 29, 1989, pages 196-201, XP000920567 page 197, colonne de gauche -----	1,7,11, 12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. e Internationale No

PCT/FR 00/02130

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9832326 A	30-07-1998	US 5981840 A	09-11-1999
		AU 6036898 A	18-08-1998
		EP 0971578 A	19-01-2000
-----			



2/13/02

Method for producing isotransgenic lines

as/

The invention relates to a method for producing isotransgenic lines, characterized in that it comprises a step which makes it possible to target the genome which has received a T-DNA after transformation of a hybrid, and also to the commercial hybrids produced using these isotransgenic lines.

The expression "isotransgenic lines" is intended to mean isogenic transgenic lines, the isogeny being defined by the state of a genotype which differs from another only by a very small number of genes (1 or 2), often obtained by backcrossing. The isotransgenic lines according to the invention are characterized in that they have a fixed pure "line of interest" genotype over the entire genome and have stably integrated the T-DNA containing the transgene. They have the particularity of being free of any fragment which originates from the transformation line and which may constitute a genetic burden for the subsequent selection steps.

The term 'T-DNA', or transfer DNA, is intended to mean the DNA fragment containing the gene of interest and the sequences which allow its expression, which is transferred and integrated into the host genome during transformation.

In the context of the invention, two types of line will be distinguished: the transformation lines, or lines suited to transformation, of the A188 type for example; and the lines unsuited to transformation,

5 hereinafter named lines of interest or agronomic lines.

The term 'elite lines' will denote agronomic lines which have a considerable commercial potential at a given period. The elite lines have agronomic properties linked to the expression of phenotypic character traits  
10 relating in particular to their vegetative growth and to yield, these agronomic properties being technical characteristics which mark their commercial potential, i.e. their ability to be used in variety selection programs for placing commercial lines on the market.

15 The development of commercial hybrids generally involves several steps: (1) developing pure homozygous parental lines, using genetic material selected with respect to its potentialities; (2) crossing these lines so as to obtain hybrids and (3)  
20 evaluating the commercial potential of these hybrids, as a function of the phenotypic character traits acquired and of their hybrid vigor, or heterosis (vegetative growth and yield). This commercial potential is all the greater since the parental lines  
25 belong to varied heterotic groups and have advantageous characteristics hence the importance given to the research and development of improved parental lines, in particular by transgenesis.

However, the plant transformation techniques developed to date do not make it possible, today, to directly and efficiently transform the great majority of agronomic lines, including the elite lines, which  
5 are recalcitrant or unsuited to transformation (zero efficiency or efficiency of the order of 1/10 to 1/100), in particular in maize.

There have therefore been many studies relating, firstly, to the improvement of the *in vitro*  
10 culturing conditions for the transformation and regeneration steps and, secondly, to the search for a starting plant material which exhibits good transformation efficiency.

A greater knowledge of the environmental  
15 factors has thus made it possible to optimize the *in vitro* culturing conditions (transformation and regeneration) for adaptation to a greater number of genotypes; however, these improvements are not sufficient to overcome the recalcitrance of certain  
20 genotypes, in particular those of agronomic interest (Armstrong et al., 1992).

The choice of a plant material other than the pure lines, which are often recalcitrant to transformation, has therefore been proposed for  
25 developing methods, in particular in maize:

1) transformation of a donor line suited to transformation, of the A188 type (Armstrong et al., 1985), followed by successive backcrosses with pure

recipient lines unsuited to transformation, so as to obtain an 'isotransgenic' line (at least 5 to 6 backcrosses necessary if perfect isogeny desired). In practice, the lines resulting from these backcrosses are, at best, 'pseudoisogenic', since a fragment of the genome of the donor line is irreversibly linked to the transgene. Depending on its size and its nature, which depend on the processes of recombination, and/or on the limited availability of a molecular marker for sorting, said fragment may constitute a genetic burden which hinders the subsequent selection steps; in addition, the phenomena of recombination which would make it possible to reduce this burden are rare events, recombination between homeologous sequences being less efficient than between homologous sequences, rendering the great efforts of backcrossing obsolete. There is therefore a considerable risk of generating negative genetic effects in the final hybrid product, via the use of starting material of the A188 type suited to transformation.

2) direct transformation of a 'transformation line x line of agronomic interest' hybrid (Ishida et al., 1996). This hybrid, which combines the transformation/regeneration abilities and the agronomic characteristics of each of the parental lines, may appear to be a starting plant material more favorable to the ultimate production of commercial hybrids. However, the results obtained by Ishida et al. (1996)

show that the efficiency of transformation of the hybrid is clearly lower than that obtained for the line of the A188 genotype. Moreover, the risks of genetic burden in the final product are not avoided since the  
5 transgene may integrate on one or the other of the chromosomes of the hybrid (i.e. on the chromosome of the donor line of the A188 type in 50% of cases).

International application WO 98/32326

(Pioneer) proposes adjusting the two parameters - in  
10 vitro culturing conditions and plant material - so as, firstly, to improve the efficiency of transformation and, secondly, to make the basic method described by Ishida et al. (1996) applicable to lines other than A188. This team mentions an efficiency of  
15 transformation which is better than that obtained with the basic protocol, but this efficiency still remains low in the case of the lines unsuited to transformation.

There was, therefore, to date, no overall  
20 method or plant material for producing true 'isotransgenic' lines, integrating both the needs for high transformation frequency (which excludes the use of pure lines unsuited to transformation) and the necessity of having true isogeny for the transgenic  
25 lines produced (which, on the contrary, indicates the use of these pure lines in order to avoid any genetic burden originating from the transformation line).

The present invention makes it possible to provide an original solution to this problem by developing a novel method for producing isotransgenic lines which integrates a step which makes it possible  
5 to target the genome which has received the T-DNA. This method, based on the transformation of a hybrid, is, in fact, characterized by a step for selecting the primary transformants which have only integrated the T-DNA into the genome of the type unsuited to transformation (a  
10 *priori* 50% of the transformants). These selected transformants will lead to the creation of isotransgenic lines after backcrossing said transformants with the parental line of agronomic interest.

15 This step for selecting the transformants which have integrated the transgene into the genome of the type unsuited to transformation has never been suggested or described in the prior art. It is advantageous in that it makes it possible to ultimately  
20 produce a 'true' isotransgenic line, i.e. a line free of any fragment originating from the line suited to transformation, while at the same time keeping an acceptable level of efficiency of transformation. In addition, it makes it possible to improve the rapidity  
25 of transfer of the gene of interest into a pure genome, by decreasing the number of backcrosses required.

The method according to the invention, which integrates this step for selecting the primary

transformants, makes it possible to satisfy better the industrial requirements; in terms of rapidity and efficiency, which the methods described until now did not.

5           In addition, this method is of great value, in particular when the line of interest is part of many hybrid formulae or when it involves lines which dominate a considerable market. It allows the production of transgenic plants which may express, by  
10 way of examples, an antisense RNA, a ribozyme or a protein of interest conferring upon it resistance to diseases/pathogens and/or an improved agronomic or nutritional quality (amino acids, oil, starch, etc.).

          The use of this method also makes it possible  
15 to vary the genetic sources of the lines from large heterotic groups, used as parental lines for the production of commercial hybrids. It also makes it possible to stack several transgenic characters in the agronomic lines without adding fragments which  
20 originate from the transformation line and which may be the subject of a genetic burden. This perspective is interesting in particular in terms of diversification of the genetic sources for the production of commercial hybrids which have conserved good or even improved  
25 hybrid vigor.

          According to a first embodiment, the method for producing isotransgenic plant lines according to the invention comprises the steps of:

a) transforming the plant cells of a plant hybrid consisting of the crossing of two parental lines, a line of interest and a line suited to transformation, with a vector carrying a T-DNA containing a transgene;

b) selecting the hybrid primary transformants which have integrated said T-DNA only, into the genome of the line of interest;

c) backcrossing, with the parental line of interest, said primary transformants selected in b), and selecting the individuals derived from these backcrosses until isotransgenic lines are produced.

Among the hybrid primary transformants, those which exhibit a monolocus or monocopy insertion of the T-DNA are preferably pre-selected, i.e. those which have preferably integrated one copy of the transgene (monocopy) or possibly several copies in tandem, at the same chromosomal locus. The monocopy individuals are particularly preferred in that they are not affected by the phenomenon of gene extinction, known for multicopy insertions, and in that they allow simplified monitoring of the transgene. The expression 'insertion without extra-border sequence' is intended to mean transformants which have integrated only the T-DNA containing the transgene, without the transfer of



plasmid sequences outside the T-DNA, named extra-border sequences.

The monolocus, preferably monocopy transformants lacking any extra-border sequence may, in particular, be selected by the Southern technique with several restriction enzymes and several probes (Southern, 1975), making it possible to identify and characterize the insertion into the genome of the plant, and thus to differentiate the transformation events.

The method is characterized in that the step for selecting the hybrid primary transformants consists in identifying the genomic sequences adjacent to the T-DNA inserted, in order to determine the parent genome which has received said T-DNA.

For each primary transformant which has proved to be in accordance with the expected phenotype and which has been selected according to the criteria - monolocus or monocopy and absence of extraborders - the genomic sequences of the host adjacent to the T-DNA may be isolated and identified, for example via a method based on PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki Rk. et al., 1988), preferably IPCR (Inverse PCR, Does Mp. Et al., 1991); the aim being to identify the parental origin of the genome which has accepted the transgene (line of agronomic interest or transformation line).

Finally, the identification, for each transformant, of the genome of the parental line which

has integrated the T-DNA may, in particular, be based on demonstrating a polymorphism of the size of the restriction fragments (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism, Burr B. et al., 1983) between the  
5 parental lines and the transformant, using, as probes, the adjacent genomic fragment(s) previously identified.

Alternatively, sequencing the genomic borders of the T-DNA and demonstrating SNP (Single Nucleotide Polymorphism) by comparison with the sequences of the  
10 parental lines may also make it possible to identify the recipient parent genome.

In addition, said identified adjacent genomic sequences may also be used as probes on a mapping population known to those skilled in the art, in order  
15 to identify the chromosome carrying the insertion and the position of this insertion, according to mapping techniques (for example Murigneux et al., 1993). This makes it possible to choose some markers around this position, to be used advantageously in the subsequent  
20 steps for selecting the backcrossed individuals.

The construction of expression vectors for the transformation (step a) is within the scope of those skilled in the art, following standard techniques, as described for example in Sambrook et al.  
25 (1989). Said expression vectors may contain a nucleotide sequence in the sense or antisense direction, encoding, for example, a protein of interest (agronomic, nutritional or therapeutic quality) or

protein for resistance to diseases and/or pathogens (herbicide, insecticide), a selection marker, an antisense RNA or a ribozyme, etc., and also regulatory sequences which allow its expression in the plant

5 (promoter-constitutive, inducible or specific/addressing peptide/terminator). Weising et al. (1988) describe, in particular, promoters,

polyadenylation sequences, selection marker genes, reporter genes, enhancers and introns which can be used

10 in the context of the invention. Among the nucleotide sequences of interest, mention may be made of all the nucleic acids which make it possible to introduce or improve a beneficial character trait in the resulting transgenic plant. For example, the nucleic acid may  
15 encode proteins or antisense RNA transcripts so as to promote an increase in the nutritional values, in the yield, in the resistance to pathogens, to diseases, etc. Such genes are in particular described in patent applications WO 91/02071 and WO 95/06128.

20 By way of example, mention may be made of:

- the bacterial gene dapA for increasing the level of lysine;
- the gene for endotoxin Bt or for a protease inhibitor or for proteins extracted from bacteria  
25 such as *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932), for resistance to insects;
- among the proteins or peptides of interest which confer novel properties of resistance to diseases,

mention will be made in particular of chitinases (WO 92/01792), glucanases (WO 93/02197), oxalate oxidase (WO 94/13790) or antibacterial and/or antifungal peptides, in particular the peptides of less than 100 amino acids rich in cysteins, such as plant thionins or defensins, and more particularly lytic peptides of any origins comprising one or more disulfide bridges between the cysteins and regions comprising basic amino acids, in particular the following lytic peptides: androctonin (WO 97/30082 and WO 99/09189), drosomicin (WO 99/02717), thanatin (WO 99/24594) or heliomicin (WO 99/53053). According to a particular embodiment of the invention, the protein or peptide of interest is chosen from fungal elicitor peptides, in particular elicitins (Kamoun et al., 1993; Panabières et al., 1995).

- the bar or pat gene which confers tolerance to bialaphos, a bacterial or plant gene encoding an EPSPS for resistance to the herbicide glyphosate (US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,312,910, US 5,633,435, US 5,627,061, US 5,310,667, WO 97/04103); the gene encoding glyphosate oxidoreductase (US 5,463,175), a bacterial or plant gene encoding a native, mutated or chimeric HPPD (WO 96/38567, WO 98/02562, WO 99/24585, WO 99/24586) which

confers tolerance to herbicides having HPPD as a target (diketones, isoxazoles, mesotrione, etc.);

- genes involved in the biosynthetic processes which lead to a change in the quality of the products of the transgenic plant, such as the genes encoding enzymes for the biosynthesis or degradation of starch (i.e. synthases, starch-branching enzymes, etc.); genes encoding grain storage proteins (i.e. subunits of glutenins, gliadins, hordeins); genes related to the strength of the grain in wheat (i.e. puroindolines).

- genes which modify the constitution of the modified plants, in particular the content and the quality of certain essential fatty acids (EP 666 918) or the content and the quality of the proteins, in particular in the leaves and/or the grains of said plants. Mention will be made, in particular, of the genes encoding proteins enriched in sulfur-containing amino acids (Korit, A.A. et al.; WO 98/20133; WO 97/41239; WO 95/31554; WO 94/20828; WO 92/14822). The function of these proteins enriched in sulfur-containing amino acids will also be to trap and store excess cysteine and/or methionine, making it possible to avoid the possible problems of toxicity linked to an overproduction of these sulfur-containing amino acids by trapping them. Mention may also be made of genes encoding

peptides rich in sulfur-containing amino acids, and more particularly in cysteins, said peptides also having antibacterial and/or antifungal activity. Mention will be made more particularly of plant defensins, and also lytic peptides of any origin, and more particularly the following lytic peptides: androctonin (WO 97/30082 and WO 99/09189), drosomicin (WO 99/02717), thanatin (WO 99/24594) or heliomycin (WO 99/53053).

5 of plant defensins, and also lytic peptides of any origin, and more particularly the following lytic peptides: androctonin (WO 97/30082 and WO 99/09189), drosomicin (WO 99/02717), thanatin (WO 99/24594) or heliomycin (WO 99/53053).

10 - genes for artificial male sterility (i.e. barnase, and PR-glucanase under the control of a suitable promoter) may also be used for the production of hybrid seeds.

The nucleic acid sequences of interest may also be introduced as a genetic tool to generate mutants and/or to assist the identification, molecular labeling or isolation of plant gene segments. Other examples are described in Weising et al.

15 also be introduced as a genetic tool to generate mutants and/or to assist the identification, molecular labeling or isolation of plant gene segments. Other examples are described in Weising et al.

The expression vector comprising the nucleic acid sequence of interest to be introduced into the plant will generally comprise a selection marker or a reporter gene, or both, in order to facilitate the identification or selection of the transformed cells. Alternatively, the selection marker may be carried by a second vector and used in cotransformation. These sequences must be flanked by suitable regulatory sequences to allow their expression in the plants. The selection markers are well known to those skilled in

20 acid sequence of interest to be introduced into the plant will generally comprise a selection marker or a reporter gene, or both, in order to facilitate the identification or selection of the transformed cells. Alternatively, the selection marker may be carried by a second vector and used in cotransformation. These sequences must be flanked by suitable regulatory sequences to allow their expression in the plants. The selection markers are well known to those skilled in

25 second vector and used in cotransformation. These sequences must be flanked by suitable regulatory sequences to allow their expression in the plants. The selection markers are well known to those skilled in

the art and include, for example, genes for resistance to antibiotics and to herbicides. Particular examples are described in Weising et al. or patent applications EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, 5 WO 95/06128, WO 96/38567 or WO 97/04103. A preferred selection marker is hygromycin B phosphotransferase (hpt), which may be derived from *E.coli*. Mention may also be made of the gene for aminoglycoside phosphotransferase of transposon n5 (AphII) which 10 encodes resistance to the antibiotics kanamycin, neomycin and G418, and also the genes which encode resistance or tolerance to glyphosate, bialaphos, methotrexate, imidazolinones, sulfonylureas, bromoxynil, dalapon and derivatives. The selection 15 marker genes which confer tolerance to herbicides are also of commercial use in the resulting transformed plants. The reporter gene is generally a gene which is not present or expressed in the recipient organism or tissue and which encodes a protein, the expression of 20 which is revealed by detectable properties, such as a phenotypic change or an enzymatic activity. Examples are given in Weising et al. Among the preferred genes, mention may be made of the chloramphenicolacetyl-transferase (cat) gene from tn9 of *E.Coli*, the beta- 25 glucuronidase (gus) gene at the uidA locus of *E.Coli*, the green fluorescent protein (GFP) gene from *Aequoria victoria*, and the luciferase gene from *Photinus pyralis*.

The regulatory sequences also include constitutive promoters, inducible promoters, tissue- or organ-specific promoters, or developmental stage-specific promoters, which can be expressed in plant cells. Such promoters are described in Weising et al.

Mention may also be made of:

- the regulatory sequences for the T-DNA of *A. tumefaciens*, including mannopine synthase, nopaline synthase and octopine synthase;
- the maize alcohol dehydrogenase promoter;
- light-induced promoters, such as the gene for the ribulose biphosphate carboxylase small subunit from a variety of species and the promoter of the gene for the chlorophyll a/b binding protein;
- the histone promoters (EP 507 698), optionally combined with the first intron of rice actin (WO 99/34005);
- the maize ubiquitin 1 promoter (Christensen et al., 1996);
- the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus, or the 19S promoter or advantageously the constitutive double 35S promoter (pd35S), described in the article by Kay et al., 1987;



- the pCRU promoter of the radish cruciferin gene, which allows expression of the associated sequences only in the seeds (or grains) of the transgenic plant obtained (Depigny-This et al., 1992);
- the pGEA1 and pGEA6 promoters corresponding to the 5' noncoding region of the GEA1 and GEA6 seed storage protein genes, respectively, from *arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993), which allow specific expression in the seeds;
- the rice actin promoter followed by the rice actin intron (pRA-RAI) contained in the pAct1-F4 plasmid described by McElroy et al., 1990;
- the wheat HMWG (high molecular weight glutenin) promoter by Robert et al., 1989;
- the promoters regulated during development, such as the maize waxy, zein or bronze promoters;
- the organ-specific promoters or developmental stage-specific promoters, such as the alpha-tubulin promoter described in US 5,635,618;
- the promoter of the maize zein gene (Pzéine) which allows expression in the albumen of maize seeds (Reina et al., 1990);

- the N promoter of a maize genomic clone, the cDNA of which is referenced in the publication by Shen et al. (1994).

Use may also be made of a regulatory promoter  
5 sequence specific for particular regions or tissues of plants, and more particularly seed-specific promoters (Datla, R. et al., 1997), especially the promoters for napin (EP 255 378), for phaseolin, for glutenin, for heliantinin (WO 92/17580), for albumin (WO 98/45460),  
10 for oelosin (WO 98/45461), for ATS1 or for ATS3 (WO 99/20775).

Use may also be made of an inducible promoter advantageously chosen from the promoters for phenylalanine ammonia lyase (PAL), for HMG-CoA  
15 reductase (HMG), for chitinases, for glucanases, for proteinase inhibitors (PI), for PR1 family genes, for nopaline synthase (nos) or for the vspB gene (US 5 670 349), the HMG2 promoter (US 5 670 349), the apple beta-galactosidase (ABG1) promoter or the apple  
20 aminocyclopropane carboxylate synthase (ACC synthase) promoter (WO 98/45445).

Other elements, such as introns, enhancers, polyadenylation sequences and derivatives, may also be present in the nucleic acid sequence of interest, in  
25 order to obtain to improve the expression or functioning of the transforming gene. By way of example of an enhancer, there is the translation activator of the tobacco mosaic virus (TMV) described in application

WO 87/07644, or of the tobacco etch virus (TEV) described by Carrington & Freed (1990). Among the introns which can be used, the Adh1S first intron from maize may be placed between the promoter and the coding  
5 sequence of a nucleic acid sequence of interest. This intron, included in a genetic construct, is known to increase the expression of a protein in maize cells (Callis et al., 1987). Use may also be made of the first intron of the maize shrunken-1 gene (Maas et al.,  
10 1991), the first intron of the castor pea catalase gene (cat-1) (Ohta et al., 1990); the second intron of the potato catalase ST-LS1 gene (Vancanneyt et al., 1990); the<sup>2</sup> intron of the tobacco yellow dwarf virus (DSV) (Morris et al. 1992); the rice actin-1 (act-1) intron  
15 (McElroy et al. 1990) and intron 1 of triose phosphate isomerase (TPI) (Snowden et al., 1996). However, sufficient expression may often be obtained without an intron (Battraw et al., 1990).

The expression vector may also comprise  
20 sequences encoding a transit peptide, so as to lead the protein encoded by the heterologous gene into the chloroplasts of the plant cells. These transit peptides, which are well known to those skilled in the art, may include simple transit peptides or multiple  
25 transit peptides obtained by combining sequences encoding at least two transit peptides. The transit peptide may be simple, such as an EPSPS transit peptide (described in US patent 5,188,642) or a transit peptide

of the ribulose-biscarboxylase/oxygenase small subunit (RuBisCO ssu) from a plant, optionally comprising some amino acids from the N-terminal portion of the mature RuBisCO ssu (EP 189 707) or a multiple transit peptide

5 comprising a first plant transit peptide fused to a portion of the N-terminal sequence of a mature protein located in the plastid, fused to a second plant transit peptide as described in patent EP 508 909, and more particularly the optimized transit peptide comprising a

10 transit peptide of sunflower RuBisCO ssu fused to 22 amino acids of the N-terminal end of maize RuBisCO ssu fused to the transit peptide of maize RuBisCO ssu as described with its coding sequence in the patent EP 508 909. A preferred transit peptide is Optimized

15 Transit Peptide (OTP) described in the patent US 5,635,618.

Plant cells from the hybrid may be transformed using techniques known to those skilled in the art.

20 Mention may in particular be made of direct gene transfer methods, such as direct microinjection into plant embryoids (Neuhaus et al., 1987), infiltration under vacuum (Bechtold et al., 1993) or electroporation (Chupeau et al., 1989), or

25 alternatively direct precipitation using PEG (Schocher et al., 1986) or bombardment with a particle gun (Fromm M. et al., 1990).

It is also possible to infect the plant with a bacterial strain, in particular of *Agrobacterium*. According to one embodiment of the method of the invention, the plant cells are transformed with a  
5 vector according to the invention, said cellular host being capable of infecting said plant cells, allowing the integration, into the genome of the latter, of the DNA sequences of interest initially contained in the genome of the abovementioned vector. Advantageously,  
10 the abovementioned cellular host used is *Agrobacterium tumefaciens*, in particular according to the method described in the article by An et al. (1986), or alternatively *Agrobacterium rhizogenes*, in particular according to the method described in the article by  
15 Jouanin et al., 1987.

Preferentially, the plant cells are transformed by transferring the T region of the tumor-inducing extrachromosomal circular plasmid Ti of *Agrobacterium tumefaciens*, using a binary system  
20 (Watson et al.). To do this, two vectors are constructed. In one of these two vectors, the T-DNA region has been removed by deletion, with the exception of the right and left borders, a marker gene being inserted between them to allow selection in the plant  
25 cells. The other partner of the binary system is a helper Ti plasmid, which is a modified plasmid which no longer has any T-DNA but still contains the vir

virulence genes required for transforming the plant cell. This plasmid is maintained in *Agrobacterium*.

Preferentially, the plant cells are transformed with *Agrobacterium tumefaciens* according to the protocol described by Ishida et al (1996), in particular using immature embryos which are 10 days post-fertilization.

Alternatively, it is possible to use the method for transforming immature embryos described in international application WO 98/32326, or the method for transforming inflorescences of monocotyledon plants, described in patent application WO 99/67357.

The two parental lines of the hybrid are thus chosen: for one, with respect to its ability to be transformed (parental transformation line) and for the other, with respect to its polyvalence or its commercial importance with regard to the market (parental line of interest).

Currently, the line which has the greatest ability to be transformed with *Agrobacterium* is the A188 line; it is this line which is generally used for producing a transformant. Among the known commercial elite lines and transformation lines, mention may be made in particular of those described by Ishida et al (1996) and Pioneer (WO 98/32326).

Among the cells which can be transformed according to the method of the invention, mention may be made, by way of examples, of the cells of large crop

plants (maize, wheat, rapeseed, sunflower, pea, soybean, barley, etc.) or of vegetable plants and flowers.

The steps for transformation (a) and  
5 selection (step b- method according to the invention) described above have made it possible to select transformants which have integrated the transgene into the genome of the type not suited to transformation. Said selected transformants contain 50% of the genome  
10 of the parental transformation line and 50% of the genome of the parental agronomic line.

The reconversion to a line with a fixed pure genome of interest (step c), involves successive backcrosses with the parental line of interest and  
15 selection of the individuals obtained according to the conventional method of phenotypic analysis or, preferentially, selection assisted by markers (Hospital et al., 1992).

This selection is based in particular on the  
20 following criteria:

(i) variability around the site of integration of the transgene, with elimination of any linked fragment originating from the donor transformation line (selection of recombination  
25 events). The desired genetic recombination is selected on one side of the gene at one generation of backcross and on the other side at the following generation.

(ii) search for the best genome of interest ratio (ratio of the % genome of agronomic interest to the % overall genome) for the entire genome.

Step (i) proves to be limiting when the  
5 transgene is inserted into a genome of the A188 type for example, since it is necessary to remove any fragment originating from this transformation line by selecting the recombination events closest to the transgene (rare events). This requires: performing the  
10 backcrossing steps on a large number of plants in order to select at least one plant correctly recombined on both sides of the insertion (2nd backcross); waiting for an additional backcross in order to apply, on a sufficient number of plants, a selection pressure over  
15 the entire genome. While it is possible to ultimately produce plants with a genome which is fixed at more than 99% genome of interest from the 4th backcross, these plants will remain, at best, pseudoisogenic at the site of insertion of the transgene.

20 When the transgene is inserted into a genome of the agronomic type (parental line of interest), and the primary transformants are selected for this characteristic according to the invention, step (i) of selection of rare recombination events is no longer  
25 necessary. Consequently, a potential decrease is obtained in the number of backcrosses necessary and/or in the number of individuals to be tested and/or in the number of markers for the selection, as will be



described in Example 4. The lightening of the overall method for reversion to the pure genome of interest adds to the major benefit of the invention, which is the production of true isogeny for the transgenic lines  
5 produced.

A subject of the invention is also a method in which the individuals in which the chromosome which has received the T-DNA has conserved a genotype entirely of the line of interest type, and which have a  
10 genome of interest to entire genome ratio of at least 75%, are selected from the first backcross in c).

The use of the method to introgress several transgenic characteristics into a plant, without adding fragments linked to the transgene which may be the  
15 subject of a genetic burden, also falls within the context of the invention.

The invention also relates to a method which makes it possible to target the parent genome which has received a T-DNA after transformation of a hybrid,  
20 comprising the identification of the genomic sequences adjacent to the T-DNA inserted.

A subject of the invention is also any transgenic plant or part of a plant, in particular seed, obtained according to the invention in one or  
25 other of the steps described above.

The true isotransgenic lines produced from hybrid transformants, characterized in that they have a fixed pure 'line of interest' genotype over the entire

genome and have stably integrated the T-DNA containing the transgene, are also part of the invention. In particular, the true isotransgenic lines produced according to the invention are elite lines.

5           According to another embodiment, the method according to the invention is characterized in that it comprises a subsequent step of crossing between the isotransgenic line according to the invention and another line of interest, in particular another  
10 isotransgenic line according to the invention containing a different transgene, for producing commercial hybrids.

          The invention also relates to the commercial hybrids thus produced.

15           The figures and examples below illustrate the invention without limiting the scope thereof.

#### LEGENDS TO THE FIGURES

**Figure 1:** plasmid map of a construct derived from pBIOS273

20 **Figure 2:** demonstration, by RFLP analysis on the primary transformants, of the parental genome which has received the T-DNA.

#### EXAMPLES

The transformation of maize, by way of  
25 example, may in particular be carried out according to the protocol of Ishida et al (1996) which uses the natural properties of *Agrobacterium tumefaciens* and the strategy of the binary system (Hiei et al., 1994).

Example 1: Preparation of vectors

The superbinary plasmid is the result of homologous recombination between an intermediate vector carrying the T-DNA containing the gene of interest  
 5 and/or the selection marker, and the Japan tobacco pSB1 vector (EP 672 752) which contains: the *virB* and *virG* genes of the pTiBo542 plasmid present in the supervirulent strain A281 of *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 37349) and a homologous region found in the  
 10 intermediate vector, which allows this homologous recombination.

The intermediate vector for introducing the gene of interest is the pBIOS 273 vector. This vector was generated in 2 main steps:

- 15 - cloning the BspDI/XhoI fragment (pAct-Bar-terNos) of the pDM 302 vector (Cao et al., 1992) into the pSB12 vector (Komari T. et al., 1996) digested with SmaI/BspDI: the pDM302 vector is digested with the XhoI enzyme (single site on the vector), thus generating 5' protruding sticky ends. These ends are made blunt after  
 20 treatment with Klenow. A second digestion is then carried out with BspDI (sticky ends). The joining of the 'blunt' XhoI and SmaI sites makes it possible to recreate the XhoI cleavage site (at position 2363).
- 25 These various steps allow oriented cloning into pSB12 and the resulting vector is named pBIOS 272.
- deleting the XhoI site at position 3363 of the pBIOS 272 vector by partial digestion with XhoI and the

action of the DNA Polymerase I large fragment. The vector obtained, which has a single XhoI site, is named pBIOS 273.

A large number of sequences encoding a gene of interest may be cloned into this pBIOS 273 vector, for the purposes of the invention, according to cloning techniques well known to those skilled in the art (Figure 1).

The intermediate vector is introduced into the cells of *A. tumefaciens* strain LBA 4404 (Hoekema et al. 1983) containing the pSB1 vector by electroporation according to well-known methods. The agrobacteria containing the superbinary vectors are selected on YT CaCl<sub>2</sub> medium in the presence of antibiotics (the genes for resistance to which are carried, respectively, by the plasmids of the various types), for example tetracyclin and spectinomycin at a concentration of 50 mg/l. Only the recombinant superbinary plasmids will carry resistance to spectinomycin (gene initially on the intermediate plasmids, which do not have an origin of replication in *Agrobacterium*, and which are, consequently, incapable of replicating in this bacterium). These plasmids are then characterized by enzymatic restriction and Southern analysis.

## 25      Example 2: Maize hybrid transformation

### a) Production of the hybrid

The lines chosen to produce the hybrid to be transformed (line A188 and line of interest) are sown

under glass and then cultivated in a phytotron or under glass after repotting. The plants are cultivated in peat and watered daily with a nutrient SuperPlantora solution (NPK content: 14-10-14 + 3% of MgO). They are  
5 subjected to a photoperiod of 16::8 and to a light intensity of 3 to 4000 Lux. The mean temperature is 25°C. As soon as the ear emerges, it is covered with a paper bag in order to avoid any contamination with foreign pollen. This bag is kept in place until the ear  
10 is harvested.

The hybrid embryo is produced either by pollinating the A188 line with pollen from the elite line, or by pollinating the elite line with pollen from A188.

15 9 to 10 days after pollination, the ear is observed in order to determine the size of the embryos. If the size is between 1 and 1.2 mm, the ear is harvested and the embryos are immediately removed to be transformed according to the protocol described by  
20 Ishida et al. (1996).

#### b) Transformation and regeneration

The transformation protocol described by Ishida et al. (1996) was chosen in the context of this example; all the media used are referenced in that  
25 protocol. The transformation begins with a coculturing phase in which the immature embryos of the maize plants are brought into contact, for at least 5 minutes, with *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 containing the

superbinary vectors. The embryos are then placed on LSAs medium for 3 days in the dark at 25°C. A first selection is performed on the transformed calluses: the 'embryo-calluses' are transferred onto LSD5 medium  
5 containing phosphinotricine at 5 mg/l and cefotaxime at 250 mg/l (elimination or limitation of contamination with *Agrobacterium tumefaciens*). This step is carried out for 2 weeks in the dark at 25°C. The second selection step is carried out by transferring the  
10 embryos which have developed on LSD5 medium, onto LSD10 medium (phosphinotricine at 10 mg/l) in the presence of cefotaxime, for 3 weeks under the same conditions as previously. The third selection step consists in excising the type I calluses (fragments of 1 to 2 mm)  
15 and in transferring them into the dark for 3 weeks at 25°C on LSD 10 medium in the presence of cefotaxime.

The regeneration of the plantlets is carried out by excising the type I calluses which have proliferated and transferring them onto LSZ medium in  
20 the presence of phosphinotricine at 5 mg/l and cefotaxime, for 2 weeks at 22°C and under continuous light.

The plantlets which have regenerated are transferred onto RM + G2 medium containing 100 mg/l of  
25 augmentin for 2 weeks at 22°C and under continuous illumination for the development step. The plants obtained are then transferred to the phytotron for the purpose of acclimatizing them.

Alternatively, the protocol described in patent application WO 98/32326 may be used to transform immature maize embryos.

Example 3: Selection of transformants which have integrated the transgene onto the genome of interest (parental genome not suited to transformation)

a) Selection of monocopy transformants lacking undesirable plasmid sequence

Among the primary transformants, those which exhibit a monolocus or monocopy insertion without undesirable plasmid sequence are therefore preferentially chosen. The Southern technique with several restriction enzymes and several suitable probes (Southern, 1975) may in particular be used to identify and characterize the insertion into the genome of the plant, thus making it possible to differentiate the transformation events. This methodology in fact makes it possible to demonstrate individual differences in the size of the restriction fragments obtained with a given enzyme and a given probe, corresponding to defined positions on the genome.

By way of example, the protocol described in Sambrook et al. (1989) may be used. The genomic DNA is extracted from leaves of the primary transformants according to a CTAB extraction protocol (Dean C. et al., 1992). This DNA is then digested according to well-known molecular biological techniques, with a

restriction enzyme which cleaves at least once within the T-DNA. Using suitable probes which hybridize on either side of the cleavage site, it is thus possible to characterize the insertion on both internal sides -  
5 right and left borders - of the T-DNA according to the suitable procedure. For the same probe and for several individuals, differences observed in the size of the bands reflect different insertion sites. The DNA fragments obtained are separated on a 0.9 to 1% agarose  
10 gel and then transferred onto a Hybond N+ membrane (Amersham). The DNA of the intermediate plasmid comprising the T-DNA carrying the gene of interest and the selection marker is included in the analysis as a control. The membrane is hybridized with probes  
15 homologous to the sequences of the transgene studied:  
- a probe specific for the selective marker gene, named S1;  
- a probe specific for the gene of interest, named S2;  
- two probes, named ex RB and ex LB (for extra Right  
20 Border and extra Left Border), which are used jointly for the hybridization. This hybridization makes it possible to eliminate the plants containing sequences external to the T-DNA (extra-border sequences). A correct integration supposes that only the T-DNA is  
25 inserted into the host genome, without extra-border sequence. Since the sequences of the basic plasmids are known (pBIOS273 derived from pSB12), the ex RB and ex LB probes are obtained by amplification with



oligonucleotides specific for the extra-border plasmid regions of the T-DNA, RB2 and 3 for ex RB, and LB2 and 3 for ex LB.

SEQ ID No. 1 Oligo RB2: 5' ATCATCCTGTGACGGAACCTTG 3'

5 SEQ ID No. 2 Oligo RB3: 5' AAGGGCGTGAAAAGGTTTATCC 3'

SEQ ID No. 3 Oligo LB2: 5' GCTCGGCACAAAATCACCAC 3'

SEQ ID No. 4 Oligo LB3: 5' CATAGTTCTCAAGATCGACAGC 3'

The plants selected at the end of this molecular analysis show no signal for hybridization with the ex  
10 RB and ex LB probes and, if possible, exhibit a single band with each of the S1 and S2 probes, reflecting a simple monocopy insertion (one copy of the selection gene and one copy of the gene of interest). According to the procedure selected, differences in the size of  
15 the bands between plants will reflect different insertions corresponding to different transformation events.

b) Identification of the genomic sequences adjacent to the inserted T-DNA

20 For each primary transformant which has proved to be in accordance with the expected phenotype and which has been selected according to the criteria - monolocus or monocopy and absence of extra-border sequences - the genomic sequences adjacent to the T-DNA  
25 can be isolated and identified, for example via a method based on PCR, the aim being to identify the parental origin of the genome which has received the transgene (line of interest or transformation line).

Several techniques based on PCR may be used, for example PCR walking (Devic et al., 1997); preferably, the commercial Universal GenomeWalker kit from the company Clontech may be used in the context of this invention. The following protocol may be followed, based on the instructions for using this kit: the DNA of the primary transformants previously selected is digested separately with 5 restriction enzymes (enzymes which generate DNA fragments having blunt ends); the enzymes used may be those recommended by the manufacturer, with a 6-base pair, bp, restriction site - DraI, Eco RV, PvuII, ScaI and StuI, or other enzymes specific for restriction sites with 4 or 5 bp. For each sample, the fragments generated are then ligated at both ends to the GenomeWalker adaptor provided with the kit. Each sample is then separated in two (samp1 and samp2) in order to be able to determine the contiguous genomic sequences at the two borders of the T-DNA. The recovery of the genomic regions flanking the two borders of the T-DNA makes it possible not only to confirm the result of the integration but also to facilitate the identification of the recipient parent and to enable verification of the genetic mapping if necessary.

Two types of oligonucleotide are designated for carrying out the successive PCR amplifications: the AP, for adaptor primer, oligos provided by the kit; and the GSP, for gene-specific primer, oligos, the choice

of which depends on the sequence of the vector derived from pSB12 and on the parameters defined in the instructions for using the kit. Among the GSP oligonucleotides which may be used according to the

5 invention, mention may be made of the oligonucleotides identified by the MacVector program (version 6) using the characteristics described in the table below.

Name	Sequence	Size	T <sub>m</sub> (°C)	Position (pBIOS273)	% GC
GSPLB1	ID NO 5	29	71.3	3020	58.6
GSPLB2	ID NO 6	29	64.9	3081	41.4
GSPLB3	ID NO 7	28	70.1	3021	57.1
GSPLB4	ID NO 8	27	70.1	3018	59.3
GSPLB5	ID NO 9	27	70.1	3019	59.3
GSPLB6	ID NO 10	27	68.7	3022	55.6
GSPLB7	ID NO 11	27	63.3	3064	40.7
GSPLB8	ID NO 12	27	63.3	3077	40.7
GSPLB9	ID NO 13	26	68.7	3019	57.7
GSPLB11	ID NO 14	26	68.7	3023	57.7
GSPLB13	ID NO 15	26	63.0	3078	42.3
GSPRB1	ID NO 16	29	67.5	571	48.3
GSPRB2	ID NO 17	29	67.5	592	48.3
GSPRB3	ID NO 18	29	67.5	655	48.3
GSPRB4	ID NO 19	29	66.2	656	44.8
GSPRB5	ID NO 20	28	67.4	570	50
GSPRB6	ID NO 21	28	66.1	591	46.4

Name	Sequence	Size	Tm (°C)	Position (pBIOS273)	% GC
GSPRB7	ID NO 22	28	66.1	654	46.4
GSPRB8	ID NO 23	28	66.1	655	46.4
GSPRB9	ID NO 24	27	67.4	569	51.9
GSPRB10	ID NO 25	27	66.0	590	48.1
GSPRB11	ID NO 26	27	70.1	614	59.3
GSPRB12	ID NO 27	27	64.6	653	44.4
GSPRB13	ID NO 28	27	64.6	654	44.4
GSPRB14	ID NO 29	26	65.9	568	50
GSPRB15	ID NO 30	26	64.5	589	46.2

A first PCR amplification, using, for example, the oligos of the GSPLB or GSPRB type depending on whether they are specific for an internal sequence of the T-DNA on the RB or LB side, is carried out as follows:

- with the AP1 oligo specific for the adaptor and the GSPRBx oligo for sample 1,
- with the AP1 oligo and the GSPLBx oligo for sample 2.

The amplification products are diluted and then subjected to a second amplification:

- with the AP2 oligo specific for the adaptor and the GSPRBy oligo for sample 1,
- with the AP2 oligo and the GSPLBy oligo for sample 2.

These GSP oligonucleotides can be used in particular for all the vectors derived from pBIOS273, in which

only the sequence of the gene of interest will be replaced.

Sequences specific for the genes inserted into the T-DNA may also be used.

5           The PCR amplification products obtained are analyzed on the gel and those which are greater than 200-300 bp are preferentially chosen. These PCR amplification products, which contain a known sequence component (between oligo GSP and border of the T-DNA)  
10 and an unknown genomic sequence component (between oligo AP and border of the T-DNA), are then cloned, for example into the pGEM-T plasmid vector (Promega) according to the supplier's recommendations, and then sequenced with the universal direct and reverse  
15 oligonucleotides. Where appropriate, internal oligonucleotides may be used to complete the data. It is thus possible to generate probes 'specific' for the host genomic sequence bordering the T-DNA.

          c) Identification of the recipient parent  
20           genome

          This last step, which leads to the identification, for each transformant, of the genome of the parental line which has integrated the T-DNA, may in particular be carried out according to the following  
25 protocol (Sambrook et al. 1989). The recovered borders are used as probes and hybridized on an electrophoresis gel transfer containing the DNA, digested separately with various restriction enzymes, of the various

transformants and of the two parental lines. The demonstration of a restriction fragment length polymorphism (RFLP) for fragments homologous to the probe, and therefore to the insertion locus, between the parental lines, makes it possible to define the recipient parent by comparison with the profile of the transformant, which is heterozygous for the insertion. The expression 'heterozygous (hemizygous) for the insertion' is intended to mean that the hybrid transformant carries the T-DNA containing the transgene on only one of the two chromosomes. Integration into the parental line of interest therefore results in an RFLP with respect to the line of interest but not with respect to the other parent. In the case of a simple insertion into the line of interest, the profile of the primary transformant is characterized by two bands: a band identical in size to that of the transformation parent and a band different in size from that of the parent of interest. By way of example, Figure 2 gives the expected profiles for the parents and the transformant, in the case of an insertion into the chromosome of one or the other of the parents (2 cases).

The identification of the recipient parent may also be obtained according to another alternative, which consists in using the sequencing data from the genomic borders of the T-DNA obtained in b) to demonstrate SNPs (single nucleotide polymorphisms)

between the parental lines. After cloning the recovered adjacent genomic sequence into pGEM-T and determining the complete sequence, oligonucleotides can be designated on the sequence and used for new PCR

5 amplifications on the parental lines and the transformant. If a nucleotide polymorphism exists between the two parents for the genomic portion which has been used to designate the oligonucleotides, an insertion into the line of interest will result in  
10 amplification for the line of interest and the transformant and no amplification for the other parent. If, on the other hand, no polymorphism is detected (amplification of the same fragment in the two parental lines, in the case of a conserved genomic fragment), it  
15 will be necessary to sequence said fragments amplified in the parental lines. The comparative analysis of the adjacent genomic sequences of the transformant, identified and sequenced in b), will then determine the parent which has received the transgene. According to  
20 one method or the other, it will be possible to differentiate the pseudoisogenic lines obtained using the methods described in the prior art from the true isotransgenic lines obtained according to the invention.

25       Example 4: Backcrosses with the parent of interest and selection of individuals until isotransgenic lines are produced

The previous steps made it possible to select transformants which had integrated the transgene into the genome of interest; moreover, said transformants contain 50% of parent transformation genome and 50% of genome of interest.

Preferentially, the selection of the plants derived from the backcrosses with the parental line of interest is assisted by markers according to known methods, in particular that described by Ragot et al. (1995).

As a comparison and demonstration of the advantages of selecting primary transformants according to the invention, the case of a process of selection after insertion of the transgene into the genome of the A188 type will be described in preamble.

The case of an insertion on a chromosome of the A188 type (no selection of primary transformants)

Conventionally, the desired genetic recombination is selected on one side of the gene at one generation of backcross and on the other side at the following generation. Since the size of the maize genome is estimated at 2000 centimorgans (cM), the recombination events to be selected during the first two backcrosses (BC1 and BC2), in order to transfer only 1/1000th of the non-elite genome linked to the transgene, will have to be located at 1 cM either side of the insertion, respectively.



The selection of the recombination events, assisted by predefined markers (close to the transgene), is carried out in BC1 and BC2 on a number of plants calculated as follows: the number N of plants to be tested in order to obtain 1 plant recombined at 1 cM with a probability of 95%, is  $N = (\log 0.05) / (\log (1 - 0.01)) \sim 300$  plants, according to the well-known law of probability. Knowing that a single recombined plant is obtained at the end of these two backcrosses, it appears, moreover, to be difficult to apply a selection for an optimal genome of interest ratio. The genome of interest ratios expected in BC1 and BC2 are, on average, 75% and 87.5%, respectively. A selection pressure over the entire genome may really be applied only in BC3, with about a hundred markers distributed over the entire maize genome (University of Missouri databank).

The reconversion to genome of interest, for this particular case, requires carrying out the backcross steps on a large number of plants (selection of rare events on the carrier chromosome) and waiting for at least the 3rd backcross to exert the second selection pressure, over the entire genome. Finally, the plants ultimately produced remain, at best, pseudoisogenic (potential genetic burden).

Backcross	Selection of recombination event at the site of insertion of the transgene		Characterization of the entire genome for the genotype of interest	
	No of plants tested	Plant with correct recombination	No of markers to be tested on residual heterozygous genome	% genome of interest
BC1	300	1	100	75
BC2	300	1	50	87.5
BC3	100		25	96.8
BC4	100		7	99.2

Total number of tests:

$$(300 \times 1) + 100 + (300 \times 1) + 50 + (100 \times 25) + (100 \times 7) = 3950 \text{ tests,}$$

to select 1 plant which is **pseudoisogenic** at the site of the transgene (carries 1/1000 of the A188 genome

- 5 linked to the transgene, i.e. on average 50 to 80 genes, the maize genome having, on average, 50 000 to 80 000 genes), and with a genome fixed at more than 99% genome of interest in BC4.

The case of an insertion on a chromosome of the parental line of interest (selection according to the invention of the corresponding primary transformant, with backcrosses with the parent of interest)

- 10 Depending on the orientations chosen as a function of the priorities given to the biotechnology and/or the production/yield and/or the selection,
- 15

several selection schemes are possible, integrating, where appropriate, a preselection on the chromosome which has received the insertion. Unlike the case of an insertion into a genome of the A188 type, recombination events located far from the transgene or no recombination on the chromosome which has received the transgene will be selected here.

By way of examples, the following options may be mentioned.

- 10            Option 1: No selection at the site of integration of the transgene; selection gene of interest ratio from BC1.

Backcross	Selection of recombination event at the site of insertion of the transgene		Characterization of the entire genome for the genotype of interest	
	No of plants tested	Plant with correct recombination	No of markers	% genome of interest
BC1	100		100	87.5
BC2	100		25	≈ 100
BC3	100		7	≈ 100

Total number of tests:  $(100 \times 100) + (100 \times 25) + (100 \times 7) =$

- 15    13200 tests, to select 1 plant truly isogenic at the site of the transgene and with a genome fixed at ≈ 100% genome of interest in BC3 (gain of one backcross).

Option 2: Selection in BC1 of the individual having the chromosome carrying the transgene which is entirely of the line of interest type; selection in BC3 for the gene of interest ratio.

5            Since the chromosome on which the T-DNA is inserted is known (mapping), it is possible to select, in BC1, using 10 markers distributed over this chromosome, a plant for which the integrity of the recipient chromosome of interest is conserved (no  
10 recombination event). Since it is known that the chromosomes are, on average, 200 cM in length, the probability of having a plant with no recombination event is  $P = (0.99)^{200} \sim 0.14$ . The number N of plants to be tested with a 95% probability of obtaining it is  $N =$   
15  $(\log 0.05) / (\log (1 - 0.14)) \sim 20$ .

The plant thus selected will be backcrossed with the parent of interest until total reconversion (100%) to the genome of interest is obtained over the entire genome.

Backcross	Selection of elite genome integrity on the chromosome carrying the transgene (10 markers)		Characterization of the entire genome for the genotype of interest	
	No of plants tested	Plant with elite chromosome	No of markers	% genome of interest
BC1	20	1		75
BC2	100			87.5
BC3	100		25	≈ 100
BC4	100		7	≈ 100

Total number of tests:  $(20 \times 10) + (100 \times 25) + (100 \times 7) = 3400$  tests, to select 1 plant truly isogenic at the site of the transgene and with a genome which is fixed at  $\approx 100\%$  genome of interest from BC3.

5 Depending on the schemes, a decrease in the number of backcrosses (rapidity of production), or a decrease in the number of plants to be used for the backcrosses, will be sought in addition to the isogeny actually obtained according to the method of the  
10 invention.

#### Example 5: Production of commercial hybrids

It is possible to cross said isotransgenic lines produced in Example 4, for the purpose of producing commercial hybrids, according to techniques  
15 known to those skilled in the art and their knowledge

in terms of blooming for each parental elite line (Gallais A. et al., 1983).

Example 6: Determination of the genome of insertion of the transgene

5           13 events were obtained after transformation of hybrid embryos according to the protocol described above in Example 2. These events were then analyzed by Southern, to determine the number of copies of the transgene integrated, as described above in

10 Example 3(a). 3 of these events proved to be monocopy.

          The transformant 152-2E, chosen for the genomic border recovery described below, was obtained after transformation with the pRec 290 recombinant superbinary plasmid derived from pBIOS 290, derived  
15 from pBIOS 273 by integrating, at the XhoI site, a cassette "Pro HMWG-PhytI-Nos 3' - Pro HMWG-PhytII-Nos 3'". Said cassette is obtained according to conventional cloning techniques, using the wheat Pro HMWG sequence (Roberts et al The Plant Cell. 1 :569-  
20 578, 1989), the PhytI (accession No. EMBL, GenBank: AJ223470) and PhytII (accession No. EMBL, GenBank: AJ223471) nucleotide sequences and the 3' Nos sequence (Depicker et al., Mol. Gen. Genet. 235 (2-3): 389-396, 1992), and suitable restriction enzymes.

25           The recovery of the genomic borders was carried out on the right border (RB) side by the anchored PCR technique using the Genome Walker kit (Clontech laboratories inc., Palo Alto, California). As

described in Example 3 (b), the identification of the genomic sequences adjacent to the inserted T-DNA comprises the following steps:

The GSPRB3/AP1 pair of oligonucleotides made it possible to carry out the first PCR on DNA of the transformant 152-1E digested with EcoRV. The product of this amplification was then subjected to a second PCR with the GSPRB9/AP2 pair of oligonucleotides.

The characteristics of the GSPRB3 and GSPRB9 oligonucleotides are described in the table of Example 3 and correspond to the attached sequence ID Nos. 18 and 24.

The AP1 and AP2 oligonucleotides are those provided in the Genome Walker kit and the PCR conditions are those recommended by the manufacturer Clontech. The 380 bp border fragment obtained in this final step was cloned into the pGEMT vector (Promega corporation, Madison, Wisconsin), in order to be amplified and used as a probe.

The identification of the recipient genome described in Example 3 (c), using the recovered border fragment, consists in hybridizing this probe fragment on an electrophoresis gel transfer containing the DNA of the transformant 152-2E digested with EcoRV and also the DNA of the 2 parental lines of the hybrid (A188 and L2) and that of 6 other transformants.

The result of the hybridization is represented on Figure 3: on this autoradiograph, DNA

corresponding to 7 different transformants is visualized, in the knowledge that there are from 1 to 3 plants per transformant.

The hybridization with the border probe  
5 reveals 1 band specific to the A188 genotype (1.7 Kb) and 1 specific for the elite line L2 (2.5 Kb). These 2 bands are found in all the transformants (proving that they are derived from the hybrid), except for the event t152-1E, which, itself, exhibits a lower band at  
10 approximately 0.8 Kb. It is deduced therefrom that the transgene is inserted into the expected 1.7 Kb EcoRV fragment of the genome of the A188 line.

This experiment therefore confirms the possibility of identifying, according to the protocol  
15 described, the genome of insertion of the T-DNA in the case of a transformant produced by the hybrid transformation technique, the A188 genome in this precise case.

It is also possible to obtain, according to  
20 the same protocol, transformants for which the insertion of the T-DNA takes place in the elite genome, with a probability of 1 transformant out of 2 on average.

When the genome of the elite parent is  
25 identified as being the genome which has received the insertion of the T-DNA, backcrosses may be carried out with the parent of interest and tested by selection



until isotransgenic lines are produced, as described above in Example 4.

#### BIBLIOGRAPHY

- 5 An et al, Plant Physiol., 81 : 86-91, 1986.  
Armstrong, C.L. et al., Maize Genet. Coop. News Letter 59:92-93, 1985.  
Armstrong C.L. et al., Theor Appl Genet 84 :755-762, 1992.
- 10 Battraw et al., Plant Mol. Biol. 15 :527, 1990,  
Bechtold N. et al., Comptes rendu Académie des Sciences Paris [Reports of the Academy of Sciences, Paris] Serie [Series] 3, 316 : 1194-1199, 1993.  
Burr B. et al., Genetic Engineering : principles and  
15 methods. Setlow A, Hollaender (eds.) Plenum press NY 5: 45-59, 1983.  
Cao et al., Plant Cell Reports : 11 : 586-591, 1992.  
Callis et al., Genes Dev., 1 : 1183, 1987.  
Carrington J.C. and Freed D.D, Journal of Virology,  
20 64(4): 1590-1597, 1990.  
Chupeau et al., Biotechnology, 7(5): 503-508, 1989.  
Christensen et al., Transgenic Res., 5: 213, 1996.  
Datla R. et al., Biotechnology Ann. Rev., 3: 269-296, 1997.
- 25 Dean C. et al., Plant Journal, 2, 69-81, 1992.  
Depigny-This et al., Plant. Mol. Biol 20: 467-479, 1992.

- Devic et al., Plant Physiol and Biochem, 35(4): 331-33, 1997.
- Does Mp et al., Plant. Mol. Biol., 17(1): 151-3, 1991.
- Fromm M. et al., Biotechnology, 8: 833-839, 1990.
- 5 Gallais A. et al., Agromais [Agromaize], 20, 40, 1983.
- Gaubier et al., Mol. Gen. Genet., 238: 409-418, 1993..
- Hiei et al., The plant Journal 6: 271-282, 1994.
- Hospital et al., Genetics, 132: 1199-1210, 1992.
- Hoekema et al, Nature, 303, 179-180, 1983.
- 10 Ishida et al., Nature Biotechnology, 14: 745-750, 1996.
- Jouanin et al., Plant Sci., 53: 53-63, 1987.
- Kamoun S. et al., Mol Plant Microbe Interact, 6(5): 573-81, Sept-Oct 1993.
- Kay et al., Science 236: 1299-1302. 1987.
- 15 Komari T. et al., The Plant Journal. 10(1): 165-174, 1996.
- Korit A.A. et al., Eur. J. Biochem., 195, 329-334, 1991.
- Maas et al., Plant Mol. Biol., 16: 199, 1991.
- 20 McElroy et al., Plant Cell, 2: 163-171, 1990.
- Morris et al., Virology, 187: 633, 1992.
- Murigneux et al., Theor. Appl. Genet. 87: 278-287, 1993.
- Neuhaus G. et al., Theoretical and Applied Genetics, 75(1): 30-36, 1987.
- 25 Ohta et al., Plant Cell Physiol, 31: 805, 1990.
- Panabieres F. et al., Mol Plant Microbe Interact, 86(6): 996-1003, Nov-Dec 1995.

- Ragot et al., Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires [Techniques and uses of molecular markers], Les Colloques, No. 72, Ed Reina et al., N.A.R., 18: 6426, 1990
- 5 Robert et al., Plant Cell, 1: 569-578, 1989.  
Saiki Rk. et al., Science 29: 487-491, 1988.  
Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989.
- 10 Schocher et al., Biotechnology, 4: 1093-1096, 1986  
Shen et al., Plant. Mol. Biol., 26: 1085-1101, 1994.  
Snowden et al., Plant Mol. Biol., 31: 689, 1996.  
Southern, Journal of molecular Biology, 98: 503-517, 1975.
- 15 Vancanneyt et al., Mol Gen. Genet. 220: 245, 1990.  
Watson et al., Adn recombinant [recombinant DNA], Ed. De Boeck université [De Boeck University], 273-292.  
Weising et al.: Annual Rev. Genet, 22: 241, 1988.

CLAIMS

5 1. A method for producing isotransgenic plant lines, comprising the following steps of:

a) transforming the plant cells of a plant hybrid consisting of the crossing of two parental lines, a line of interest and a line suited to transformation, with a vector carrying a T-DNA containing a transgene;

10 b) selecting the hybrid primary transformants which have integrated said T-DNA only, into the genome of the line of interest;

15 c) backcrossing, with the parental line of interest, said primary transformants selected in b), and selecting the individuals derived from these backcrosses until isotransgenic lines are produced.

20 2. The method as claimed in claim 1, characterized in that the step for selecting the hybrid primary transformants consists in identifying the genomic sequences adjacent to the T-DNA inserted, in order to determine the parent genome which has received said T-DNA.

25 3. The method as claimed in claim 2, in which the determination of the parent genome which has received said T-DNA, using said genomic sequences

adjacent to the T-DNA, is carried out according to an RFLP technique or a sequencing method.

4. The method as claimed in one of claims 1 to 3, in which the individuals in which the chromosome which has received the T-DNA has conserved a genotype entirely of the line of interest type, and which have a genome of interest to entire genome ratio of at least 75%, are selected from the first backcross in c).

5. The method as claimed in one of the preceding claims, characterized in that it comprises a subsequent step of crossing between the isotransgenic line according to the invention and another line of interest, in particular another isotransgenic line containing a different transgene, for producing a hybrid line.

6. The method as claimed in one of the preceding claims, characterized in that the plant cells originate from a large crop species chosen from maize, wheat, rapeseed, sunflower, pea, soybean and barley, or from a vegetable or floral species.

7. The method as claimed in one of the preceding claims, characterized in that the T-DNA comprises in particular a nucleotide sequence encoding a protein which confers agronomic properties and/or properties of resistance to diseases.

8. The method as claimed in one of the preceding claims, characterized in that the

isotransgenic lines produced are commercial elite lines.

9. The use of the method as claimed in one of claims 1 to 8, characterized in that it allows the introgression of several transgenic characteristics into a plant, without adding fragments linked to the transgene which may be the subject of a genetic burden.

10. A method which makes it possible to target the parent genome which has received a T-DNA after transformation of a hybrid, comprising the identification of the genomic sequences adjacent to the T-DNA inserted.

11. A transgenic plant or part of a plant, in particular seed, obtained according to the invention in one or other of the steps described in claim 1 or 5.

12. A true isotransgenic line produced from hybrid transformants as claimed in one of claims 1 to 7, characterized in that they have a fixed pure line of interest genotype over the entire genome and have stably integrated the T-DNA containing the transgene.

13. A commercial hybrid produced according to the method described in claim 5.

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
1 février 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/07632 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/63,  
15/82, 5/10, A01H 5/00, 5/10

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02130

(22) Date de dépôt international: 25 juillet 2000 (25.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/09990 28 juillet 1999 (28.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): **RHO-  
BIO** [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte postale 9163,  
F-69263 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **PEREZ,**  
Pascual [FR/FR]; 17, chemin de la Pradelle, Varennes,  
F-63450 Chanonat (FR). **GARCIA, Denise** [FR/FR]; 48,  
route de la Roche Blanche, F-63450 Le Crest (FR).

(74) Mandataires: **TETAZ, Franck** etc.; Aventis CropScience  
S.A., Dépt. Propriété Industrielle, 14-20, rue Pierre Baizet,  
Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée:**

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

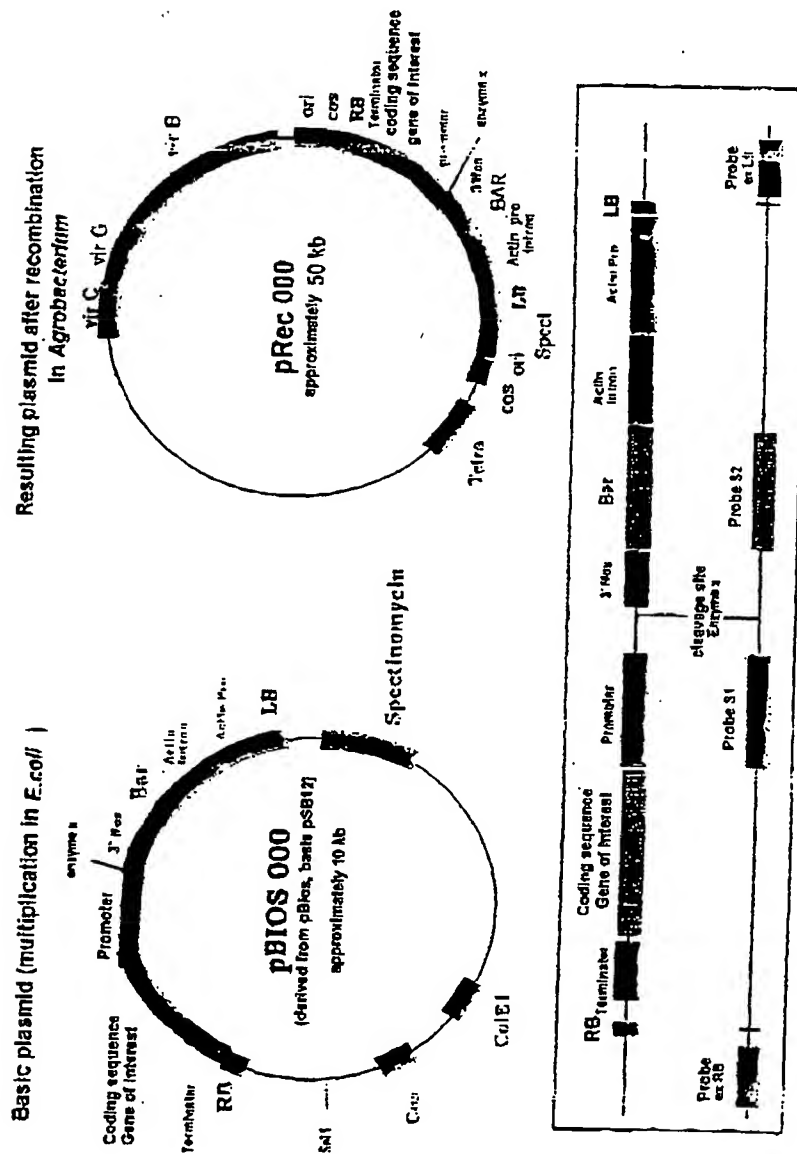
WO 01/07632 A1

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING ISOGENIC TRANSGENIC LINES

(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE LIGNEES ISOTRANSGENIQUES

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining isogenic transgenic lines, characterised in that it comprises a step for targeting the genome receiving a T-DNA after transformation of a hybrid. The invention also concerns commercial hybrids produced by cross-breeding of the resulting isogenic transgenic lines with other lines of interest.

(57) Abrégé: Cette invention concerne un procédé d'obtention de lignées isotransgéniques caractérisé en ce qu'il comprend une étape permettant de cibler le génome receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride. Rentrent également dans le cadre de l'invention les hybrides commerciaux produits par croisement des lignées isotransgéniques ainsi obtenues avec d'autres lignées d'intérêt.





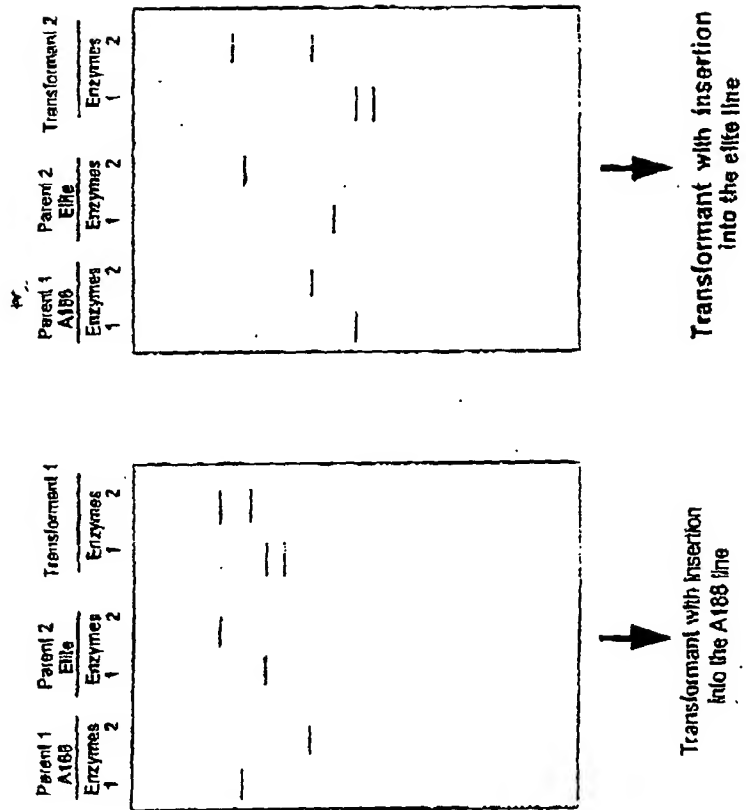


Figure 2 : Hybridization of blots with probes specific for the genomic borders of each of the transformants